

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



**Karolína Skipalová**

Antikoagulační faktory krevsajících parazitů  
Anticoagulation factors of haematophagous parasites

Bakalářská práce

RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Praha, 2012

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Liborovy Mikešovi, Ph.D. za konzultace, trpělivost a cenné rady. Zároveň bych chtěla poděkovat celé své rodině za podporu při psaní bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.08.2012

Podpis:

# Obsah

<b>1. Abstrakt.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Úvod.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Hematofágie.....</b>	<b>5</b>
<b>5. Koagulační kaskáda .....</b>	<b>6</b>
5.1. Vnější systém.....	8
5.2. Vnitřní systém.....	9
<b>6. Regulace koagulační kaskády.....</b>	<b>10</b>
6.1. Inhibitory Kunitz typu.....	11
6.2. Inhibitory Kazal typu.....	12
6.3. Metody k posouzení koagulační aktivity enzymů a inhibitorů.....	12
6.3.1. Metody s chromogenními a fluorescenčními substráty.....	12
6.4. Koagulační testy.....	13
6.4.1. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas.....	13
6.4.2. Protrombinový - Quickův čas.....	13
6.4.3. Trombinový čas.....	14
<b>7. Antikoagulační faktory vybraných skupin hematofágů.....</b>	<b>14</b>
7.1. Helminți .....	14
7.1.1. Trematoda .....	14
7.1.1.1. Čeleď Schistosomatidae.....	14
7.2.1. Nematoda.....	16
7.1.2.1. Čeleď Ancylostomatidae.....	16
7.1.2.2. Čeleď Trichostrongylidae.....	17
7.2. Hirudinea.....	18
7.3. Arthropoda.....	20
7.3.1. Ixodida.....	20
7.3.1.1. Čeleď Ixodidae.....	20
7.3.1.2. Čeleď Argasidae.....	25

7.3.2. Heteroptera.....	26
7.3.3. Diptera.....	28
7.3.3.1. Čeled' Culicidae.....	28
7.3.3.2 Čeled' Phlebotomidae.....	29
7.3.3.3. Čeled' Ceratopogonidae.....	29
7.3.3.4. Čeled' Glossinidae.....	30
7.3.3.5. Čeled' Simuliidae.....	30
7.3.3.6. Čeled' Tabanidae.....	31
7.3.3.7. Čeled' Muscidae.....	32
7.3.4. Anoplura.....	32
<b>8. Závěr.....</b>	<b>32</b>
<b>9. Použití literatura.....</b>	<b>35</b>

## 1. Abstrakt

Přítomnost antihemostatických molekul je nezbytná k úspěšnému přijímání potravy všech organismů, kteří se živí krví. Jsou to vasodilatační, antikoagulační molekuly a apyrázy, nabourávající se do hostitelské hemostázy, a tím celý proces blokují. Tato práce se snaží shrnout dostupné informace o antikoagulačních faktorech hematofágních parazitů. U krevsajících skupin helmintů, členovců a pijavek se jedná zvláště o inhibitory serinových proteáz, které mají svou inhibiční aktivitu namířenou především proti trombinu a faktoru Xa. Jde o dva klíčové faktory v koagulační kaskádě. Faktor X je první člen, kde se sbíhá vnitřní a vnější koagulační cesta. Zároveň díky němu vzniká aktivní forma proteinu trombinu, odpovídající za přeměnu rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin, který krvácení zastavuje. Kromě těchto dvou faktorů dohází však inhibici i dalších členů kaskády. Je to např. inhibice komplexu faktoru VII a TF, která byla popsána u měchovců a klíšťat. Antikoagulační faktory hrají zásadní roli v přenosu patogenů krví z vektora do hostitele. Čím déle je krev v tekutém stavu, tím je větší šance nákazy patogenem.

**Klíčová slova:** krev, fibrinogen, fibrin, hemostáze, koagulace, hematofágie

## 2. Abstract

Presence of antihemostasis molecule is essential for the successful reception of food organisms that feed on blood. They are vasodilators, anticoagulant molecules and apyrases that break into the host hemostasis, thus blocking the whole process. This work summarizes all available information about the anticoagulant factors of haematophagous parasites. The blood sucking groups of helminths, arthropods and leeches is particularly inhibitors of serine proteases, which have their inhibitory activity directed primarily against thrombin and factor Xa. These are two key factors in the coagulation cascade. Factor X is the first member, where it sets the intrinsic and extrinsic coagulation pathways. At the same time it arises due to the active form of the protein thrombin, which is responsible for the conversion of soluble fibrinogen to insoluble fibrin, which stops bleeding. In addition to these two factors are inhibited of other members of the cascade. For example the inhibition of komplex factor VII and TF, which has been described in ticks and hookworms. Anticoagulation factors play a crucial role in the transmission of pathogens by blood from the vector into the host. The longer the blood is a liquid, the greater the chance of transmission of the pathogen.

**Keywords:** blood, fibrinogen, fibrin, hemostasis, coagulation, haematophagy

### 3. Úvod

Parazitické organismy, živící se krví, najdeme v rámci různých skupin živočichů. Zejména pak mezi členovci, helminty a pijavkami. Každý hematofágní parazit musí zajistit, aby se krev během sání nesrážela a zůstala v tekutém stavu. Srážením by se zablokoval další její přísun. Parazitům to zajišťují mj. antikoagulační molekuly, které jsou většinou produkovány specializovanými žlázami.

Krevní koagulační kaskáda pomáhá zachovávat cévní integritu. Jde o propracovaný systém enzymatických reakcí koagulačních faktorů, na jehož konci vzniká nerozpustná fibrinová zátka, zastavující krvácení v místě poškození cévy. Antikoagulační faktory inhibují koagulační faktory, a tím brání kaskádě hostitele vytvořit konečnou sraženinu. Krevsající paraziti mají své antikoagulační molekuly namířené především proti jednotlivým koagulačním faktorům. Jedná se o inhibitory proteáz a fibrinolytické enzymy.

Většina parazitických skupin, prezentovaných v této práci, způsobuje nebo přenáší závažná infekční onemocnění. Svým působením či přenosem nejrozličnějších patogenů vyvolávají těžká onemocnění, jako jsou horečka dengue, leishmanióza, malárie, Chagasova nemoc, schistosomóza, onchocerkóza či lymfatická filarióza. Antikoagulační faktory k šíření těchto chorob pomáhají blokací koagulační kaskády hostitele.

Cílem mé bakalářské práce je shrnout a zpracovat dostupné informace o antikoagulačních faktorech jednotlivých parazitických krevsajících skupin, o jejich chemické povaze, mechanismech účinku, metodách detekce jejich biologické aktivity a také o samotné koagulační kaskádě formou literární rešerše. V rámci diplomové práce je možnost pokračovat studiem antikoagulačních faktorů u krevsajících Monogeneí. Monogenea patří mezi parazitické živočichy, konkrétně mezi ploštěnce. Ve většině případů žijí ektoparaziticky na rybách, kde mohou být nebezpečnými patogeny. Řada druhů způsobuje závažné ztráty v chovech ryb. Na rozdíl od ostatních parazitických ploštěnců nemají žádné mezihostitele. Larva se po přichycení na žábry či kůži hostitele postupně přetváří v dospělé. Živí se mukusem a tkáňovým detritem, ale je známo i značné množství krevsajících druhů, o jejichž antikoagulačních faktorech nemáme relevantní údaje. Studie by probíhala v rámci diplomové práce a grantového projektu, který se bude zabývat krevsajícími druhy diplozoidních monogeneí.

## 4. Hematofágie

Organismy, které se živí krví, označujeme jako hematofágní. Tento způsob obživy je známý u krevsajícího hmyzu, některých dalších členovců, zástupců parazitických hlístic, pijavek či u motolic. Hematofágní bychom však našli i mezi savci u upírů rodu *Desmodus*.

Hematofágové často způsobují hostiteli řadu nepříjemností. Ať už se jedná o záněty, alergickou reakci, ztrátu krve, či více těchto událostí najednou. Větší nebezpečí však spočívá ve schopnosti efektivně přenášet patogeny, což platí především u hmyzích zástupců. Tyto patogeny zapříčiňují řadu onemocnění u lidí i zvířat. Pro představu, 8 z 10 nejdůležitějších infekčních onemocnění na světě je parazitárních nebo parazity přenášených (WHO). Z toho 7 nemocí je přenášeno krevsajícími členovci. Patří mezi ně leishmanióza přenášená zástupci dvoukřídleho hmyzu z čeledi Phlebotomidae, malárie jako onemocnění způsobené prvoky z rodu *Plasmodium* a přenášené komárem rodu *Anopheles*, dále je to Chagasova nemoc šířená krevsajícími ploštici z čeledi Reduviidae, komáry přenášené lymfatické filariózy a horečka dengue, nebo onchocerkóza, kterou šíří muchničky. Osmé onemocnění schistosomóza je helmintóza působená motolicemi z čeledi Schistosomatidae. Na našem území je ze zdravotnického hlediska významná klíšťová encefalitida, infekční virové onemocnění přenášené klíšťaty rodu *Ixodes*. Klíšťata přenášejí i bakterie rodu *Borrelia* působící onemocnění zvané lymfská borelióza (Rahn, 1991).

Adaptací na tento způsob života došlo k rozmanitému uzpůsobení ústního ústrojí v rámci jednotlivých parazitických skupin. Odlišnosti v morfologii ústního ústrojí panují u zástupců nejpočetnější třídy živočichů - Insecta. Bodavě sací ústrojí s vysunovatelným styletem nalezneme u vši a mohutný sosák (rostrum) u ploštic. Součástí ústního ústrojí klíšťat je zuby opatřený hypostom, který pomáhá klíštěti během sání udržet se na hostiteli. Další odlišnosti v délce a šířce sosáků objevíme u jedné z nejpočetnějších skupin hmyzu – dvojkřídle. U hlístic stojí za zmínku mohutná ozubená ústní kapsula čeledi Ancylostomatidae. Ústní otvor skupiny Monogenea je součástí hlavové části (prohaptoru). U některých druhů jsou přítomné bukální přísavky. Pijavky přijímají krev svalnatou přísavkou a hltanem.

Stejně jako se liší morfologie ústního ústrojí, liší se i strategie příjmu krve. Některé druhy (komáři, moucha tse-tse) sají na svém hostiteli jen pár minut, zatímco zástupci dalších skupin mohou sát několik desítek minut (ploštice), klíšťata dokonce až několik dní (Ribeiro a Francischetti, 2003; Wikel a kol., 1994).

Konkrétně u hmyzu se vyvinuly dva odlišné způsoby, kterými k sání krve dochází.

Prvním způsobem je krev sána přímo z krevní kapiláry. Parazitům, kteří přijímají potravu takto, říkáme solenofágní, a jsou to např. vši, ploštice či blechy. Druhým způsobem je krev čerpána z hematomů, vytvářejících se v místě vpichu. Těmto zástupcům říkáme thelmofágní a patří mezi ně například ovádi či muchničky. Skupiny mají odlišné vlastnosti slin a odlišnou rychlost, jakou jsou schopni krev nasát. Solenofágní hmyz má dlouhé a tenké bodavé stylety, krev saje rychleji, než je schopna vytékat z cévy. Vzniká tím podtlak, kdy je céva přitisknuta k ústnímu ústrojí a nevzniká hematoma. U thelmofágního hmyzu se vyvinuly stylety silnější. Jeho sliny obsahují řadu enzymů a dalších faktorů, způsobující rozsáhlé poškození tkáně a stěn cév okolo místa vpichu. Krev nasává pomaleji, než vytéká z poškozené cévy, čímž v místě sání vzniká hematoma (Volf a kol., 2007).

Během sání krve musí paraziti inaktivovat hostitelské obranné mechanismy, které zapříčiňují srážení krve a stažení cévy, čímž úbytek krve zablokují. Na překonání těchto mechanismů se u hematofágů vyvinula celá řada antihemostatických a imunomodulačních faktorů schopných v místě sání inhibovat všechny fáze hemostázy. Přítomnost těchto reakcí je podmínkou pro úspěšné sání. Inhibiční látky jsou ve většině případů produkovány specializovanými slinnými žlázami. Např. u měchovců (Ancylostomatidae) byla přítomnost inhibičních molekul zaznamenána v jícnu v esofageálních žlázách (Thorson a kol., 1956).

Klíčovou roli v příjmu krve u všech krevsajících živočichů mají antihemostatické molekuly (Law a kol., 1992), kam mimo apyráz, schopných inhibovat agregaci trombocytů, a vasodilatačních látek se schopností rozšiřovat cévy a zvyšovat průtok krve, spadají i antikoagulační faktory (Ribeiro, 1995; Ribeiro a Francischetti, 2003; Salzet, 2001; Hovius a kol., 2008), kterými se v této práci budu zabývat.

## **5. Koagulační kaskáda**

Mezi základní obranné mechanismy, odehrávajícími se při poranění cévy v krevním řečišti, řadíme procesy spojené se srážením krve (hemostáza) a následné rozpuštění vzniklé fibrinové zátky (fibrinolýza). Hemostatický systém tvoří tři základní složky: koagulační kaskáda (vede ke vzniku krevní sraženiny), agregace a degranulace krevních destiček (slouží k tvorbě krevní zátky) a vazokonstrikce (snižuje tok krve).

Hemokoagulační systém je sled enzymatických reakcí vedoucí ke vzniku trombinu a ke tvorbě fibrinového koagula přeměnou rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin (Hellmann a Hawkins, 1964). Vytvořená fibrinová zátka blokuje místo poranění a nedochází



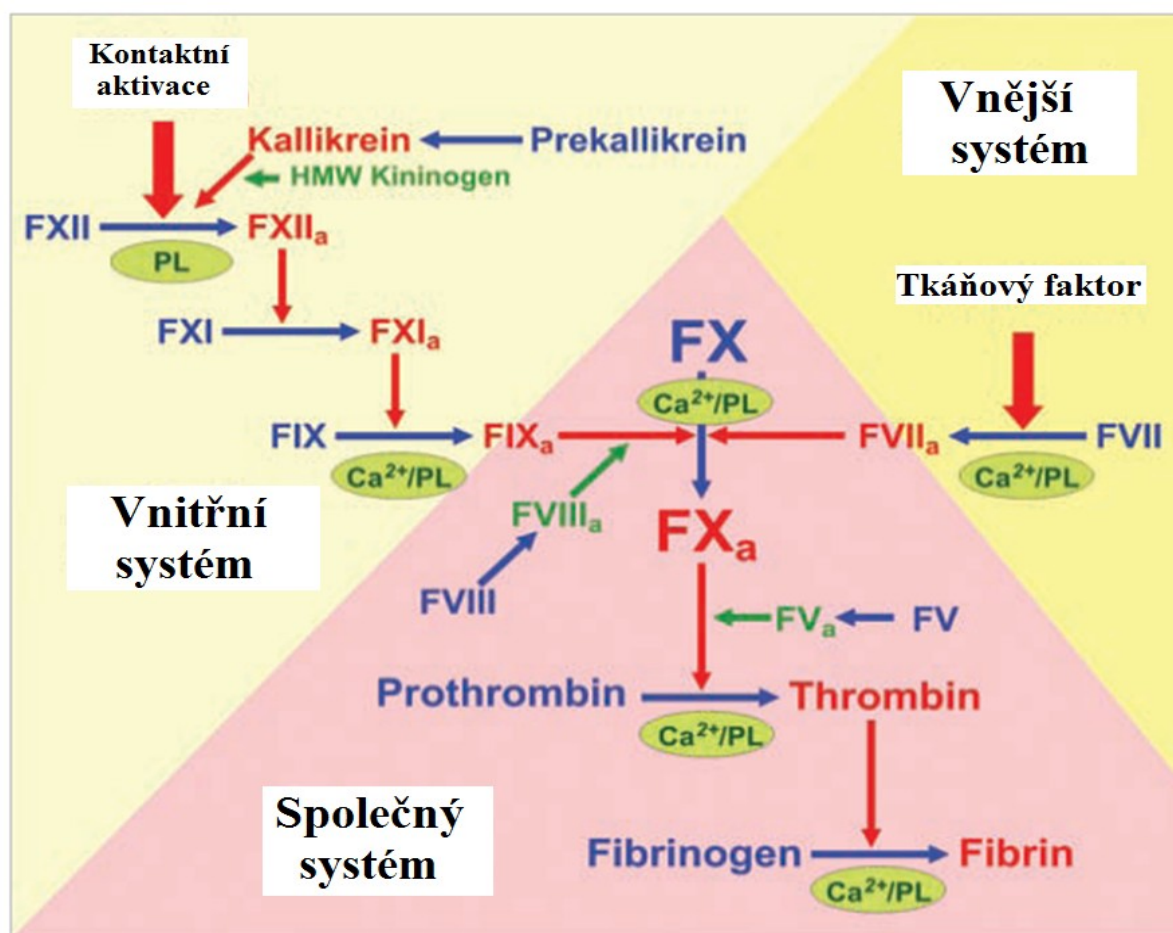
tak k dalšímu úniku krve. Agregaci a degranulaci krevních destiček lze vyvolat jejich navázáním na kolagen, obnaženým při poranění cévy, přes trombin, vznikající při srážení krve, nebo ADP, který je uvolňován ostatními destičkami. Aktivované trombocyty změni tvar a v přítomnosti fibrinogenu, který se na aktivované destičky váže, se shlukují a vytvářejí primární destičkovou zátku. Degranulující trombocyty uvolňují ADP a ATP, což vede k amplifikaci koagulační kaskády reakcí koagulačních faktorů, na jejímž konci se z fibrinogenu stane nerozpustný fibrin, vytvářející síť. Ta zpevní masu rozpadlých destiček a zachycených červených krvinek a vytvoří definitivní krevní sraženinu. Trombocyty při degranulaci uvolňují i tromboxan a serotonin, vyvolávajícím vazokonstrikci cév a zabraňují tak průtoku krve (Pecka, 2004).

Ačkoli jsou všechny složky hemostatického systému stejně důležité a nezbytné ke správnému fungování, v této práci se podrobněji zaměřím pouze na koagulační kaskádu, jež s tématem souvisí nejvíce (viz. obr.1.).

Koagulační kaskádu tvoří 13 koagulačních faktorů, označovaných římskými číslicemi v posloupnosti, v níž byly objeveny. Aktivované formy se označují písmenem „a“. Jsou to plazmatické globuliny, glykoproteiny přirozeně přítomné v krevní plazmě (s výjimkou TF), kde kolují v neaktivní formě. Pro svoji aktivitu vyžadují proteolytické štěpení, při němž vzniká koagulačně aktivní enzym. Jediný z faktorů, který v plazmě koluje v nepatrném množství v aktivované podobě, je faktor (f)VIIa. Ale i fVII je v plazmě přítomen převážně v neaktivní podobě. Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein vykazují po rozštěpení enzymatickou aktivitu a patří mezi serinové proteázy. Jiné faktory se po rozštěpení účastní tvorby koagulačně aktivních komplexů (vnitřní tenáza, protrombináza) a chovají se jako kofaktory (fVIII, fV a vysokomolekulární kininogen-HMWK). Syntéza většiny faktorů je závislá na vitamínu K (výjimku tvoří faktor XI a XIII), stejně jako jejich funkce je závislá na iontech vápníku. Aktivace faktoru XIa nevyžaduje ionty vápníku ani povrchové fosfolipidy.

Aktivace koagulační kaskády může probíhat dvěma způsoby. V případě, že je spouštěcím impulzem reakce změněný endotel nebo změny, probíhající ve stagnující krvi, uplatňuje se tzv. „vnitřní“ systém. Je-li to odpověď na poškození tkání, vstupuje do hry tzv. „vnější“ systém koagulace. Oba systémy se v určitém bodě sbíhají do společné dráhy, která dále vede k samotné tvorbě fibrinové sraženiny (Šlechtová, 2007).

K udržení fluidity krve jsou nezbytné neustále probíhající specifické buněčné a proteinové interakce. Pouze vyvážený stav mezi prokoagulačními, inhibičními a fibrinolytickými procesy zaručuje, že nedojde k nežádoucím krvácivým stavům či naopak k nekontrolovatelnému krevnímu srážení.



• **Obr.1.** Koagulační kaskáda, (upraveno podle

[http://sbi.imim.es/web/files/projects/master/2010/Coagulation\\_serine\\_proteases/coagulationProcess.html](http://sbi.imim.es/web/files/projects/master/2010/Coagulation_serine_proteases/coagulationProcess.html))

### 5.1. Primární systém aktivace (vnější systém)

Primární systém aktivace (zvaný také vnější systém) se spouští po vazbě volně kolujícího faktoru VIIa s tkáňovým faktorem (TF). Tkáňový faktor, nazývaný též faktor III, je transmembránový glykoprotein v subendoteliální tkáni. Jeho kofaktor (neenzymatický protein) je přítomný v cévních buňkách a běžně není v kontaktu s cirkulující krví (Weiss a kol., 1989). Při poranění cévy se dostává TF do kontaktu s krví a tedy i s cirkulujícím faktorem VII, který se v plasmě přirozeně vyskytuje. Po vazbě s TF se faktor VII aktivuje a spolu s destičkovými fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  vytváří komplex vnější tenáza (Nemerson, 1988), který dále aktivuje faktor X. Aktivovaný faktor Xa vstupuje společně se svým kofaktorem, faktorem Va, destičkovými fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty do komplexu protrombináza.

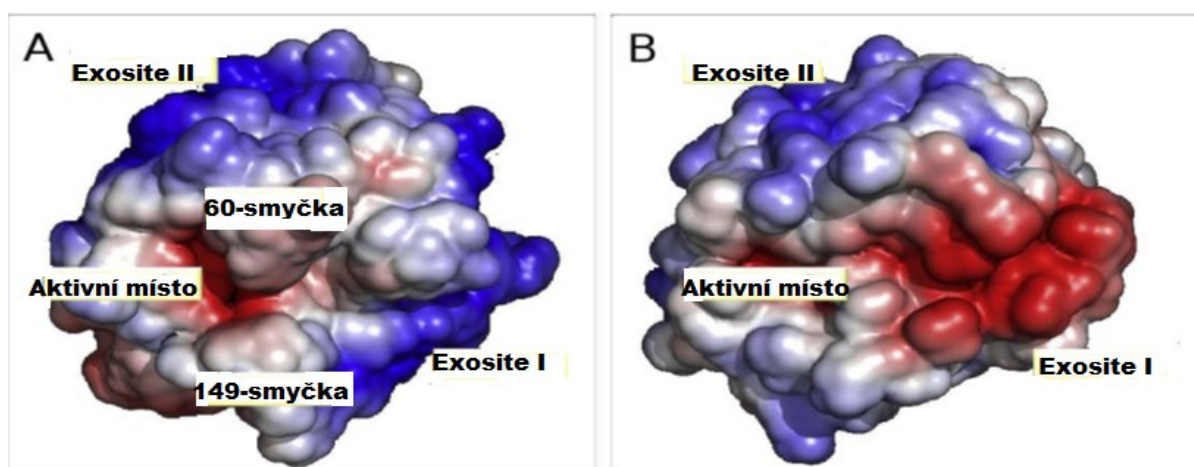
Protrombináza konvertuje přeměnu malého množství protrombinu na trombin. Takto vzniklý trombin však není schopen rozštěpit dostatečné množství fibrinogenu, ale dokáže

zpětně aktivovat koagulační faktory XI, IX, kofaktory fVIII, fV a trombocyty. Tato fáze koagulace se nazývá iniciace.

## 5.2. Přídavný systém aktivace koagulace (vnitřní systém)

Tato část kaskády se spouští zpětnými mechanismy. Malým množstvím trombinu, vzniklým cestou vnější tenázy a protrombinázy, se aktivují faktory XI a IX spolu s kofaktory fVIII a fV. Celý proces koagulace je touto cestou významně urychlen. Faktor IXa se svým kofaktorem fVIIIa vytvářejí společně s destičkovými fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty komplex vnitřní tenáza, která generuje již dostatečné množství faktoru Xa. Ten společně se svým kofaktorem fVa přeměňuje v komplexu protrombinázy již dostatečné množství protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje přeměnu glykoproteinu fibrinogenu na fibrinové, spontánně polymerující fibrinové monomery. Vzniklé polymery fibrinu jsou stabilizovány trombinem aktivovaným faktorem XIIIa (McKee a kol., 1972) a vzniká nerozpustná fibrinová sraženina. Dřívější představa o tom, že se vnitřní cesta koagulace (dnes zvaná akcesorní či přídavná) spouští ve fázi kontaktu aktivací faktoru XII s následnou aktivací faktoru XI, který tvoří komplex s neenzymatickým kofaktorem vysokomolekulárním kininogenem – HMWK, byla v současné době opuštěna. V komplexu fXI/HMWK nedochází k aktivaci fXI. Faktor XI může být aktivován fXIIa, trombinem či autoaktivací (Šlechtová, 2007).

Oba systémy hemokoagulace působí v organismu společně. Pro iniciaci koagulace je nezbytný systém vnější tenázy. Systém vnitřní tenázy je nutný pro zesílení procesu. Celý proces probíhá na povrchu krevních buněk. Iniciace na povrchu monocytů, amplifikace a propagace na povrchu krevních destiček. Průběh koagulačních reakcí není přísně kaskádovitý, dochází k celé řadě zpětných vazeb.



**Obr.2.** – molekuly A) trombinu a B) faktoru Xa. Červeně jsou vyznačeny záporně nabitě oblasti, modře oblasti nabitě kladně (upraveno podle Corral-Rodríguez a kol., 2009).

## 6. Regulace koagulační kaskády

V inhibici koagulačních faktorů hrají důležitou roli jednotlivé oblasti na povrchu molekuly. Exosite I a II (viz.obr.2.) na trombinu jsou vazebná místa pro fibrinogen. Pokud se do nich naváže inhibitor, zamezí vazbě fibrinogenu a tím přeruší tvorbu nerozpustného fibrinu. Zablokuje se i trombinem indukovaná agregace krevních destiček (Crawley a kol., 2007). Vazba inhibitoru do aktivního místa zapříčiní inhibici amidolytické aktivity trombinu. Stejně to funguje i u fXa po navázání antikoagulantu do aktivního místa. Vazba do „exosite“ má za následek inhibici tvorby trombinu.

Antikoagulace se dělí podle mechanismu účinku na přímou a nepřímou. Přímé inhibitory svojí vazbou na vybrané koagulační faktory blokuji jejich funkci. Do této skupiny patří např. hirudin, antikoagulant z pijavky *Hirudo medicinalis*. Na rozdíl od přímých antikoagulantů, nepřímé inhibitory ovlivňují koagulační faktory snížením jejich tvorby v játrech. Takto fungují např. hepariny, uplatňující se jako katalyzující kofaktor pro antitrombin (Pecka, 2004).

Inhibici můžeme dále rozdělit na nekompetitivní a kompetitivní. Nekompetitivní inhibitory se vážou na alosterická místa enzymů a nebrání tedy substrátu, aby se navázal do jeho vazebného místa, zatímco kompetitivní inhibitory soutěží s molekulami substrátu o vazebné místo na enzymu.

Regulace koagulačních faktorů je v organismu zajišťována řadou přirozených endogenních inhibitorů. Mezi hlavní inhibitory zařadíme TFPI (inhibitor tkáňového faktoru), protein C, antitrombin (AT), heparinový kofaktor II (HC II), mikroglobulin či serpiny.

Hematofágní živočichové dokáží produkovat také celou škálu inhibitorů koagulační kaskády, inhibujících hlavně aktivitu serinových proteáz. Antikoagulačními faktory jednotlivých hematofágních skupin živočichů se budu podrobněji zabývat v další kapitole. Pro srovnání zde uvedu přehled nejvýznamnějších lidských endogenních inhibitorů koagulační kaskády.

**TFPI** - Aktivace inhibitoru tkáňového faktoru probíhá současně se vznikem komplexu vnější tenázy a protrombinázy. Syntéza TFPI je vyvolána vzestupem hladiny faktoru Xa. Aktivovaný faktor Xa se váže s TFPI a je touto vazbou zablokován. Vzniklý komplex fXa /TFPI inhibuje aktivitu vnější tenázy (blokuje aktivitu tkáňového faktoru) (Sprecher, 1993).

**Antitrombin** patří mezi hlavní fyziologické koagulační inhibitory, působící silně na řadu reakcí koagulace (Lechner a kol., 1995). Ačkoli se může zdát, že antitrombin má vliv pouze

na trombin, opak je pravdou. Ve skutečnosti dokáže inhibovat prakticky všechny koagulační enzymy. Kromě trombinu působí na aktivované serinové proteázy – faktory Xa, IXa, XIa a XIIa. Vytvořením komplexu s heparinem má antitrombin posílenou inhibiční aktivitu a rychlost účinku především proti trombinu a faktoru Xa.

**Protein C** (Stenflo, 1976) není enzymový inhibitor v klasickém slova smyslu. Dokáže kontrolovat koagulaci díky regulaci aktivity komplexů IXa/VIIIa a Xa/Va. Aktivovaný protein C (APC) upravuje jejich aktivitu pomocí proteolytické inaktivace jejich kofaktorů VIIIa a Va, čímž se inhibuje systém vnitřní tenázy a protrombinázy, a tím i vznik trombinu (Debize a spol., 1995). Prekurzor APC váže trombin na endoteliální buněčný receptor trombomodulin. Trombomodulin slouží ke změně substrátové specifity trombinu a převádí prokoagulant na antikoagulant. Tímto způsobem může trombin zastavit svou vlastní tvorbu stejně jako tvorbu faktoru Xa. Účinnost proteinu C je posílena jeho kofaktorem proteinem S.

**Heparinový kofaktor II (HCII)** je specifický inhibitor trombinu se zvýšenou aktivitou v přítomnosti heparinu (Briginshaw a Shanbergem, 1974). Svou aktivitou neohrožuje žádné další proteázy, které se účastní koagulace a fibrinolýzy.

**Serpiny** tvoří velkou skupinu inhibitorů serinových proteáz (Serine Protease Inhibitor). Vyskytují se v tělních tekutinách nejen u savců, ale i u dalších druhů živočichů. Většinou se jedná o inhibitory tvořící komplex s cílovým enzymem.

Společné pro serpiny je terciální struktura, skládající se z 9 alfa helixů a 3 beta listů. Funkční domény se nacházejí blízko C-terminální domény. Oblast zvaná reaktivní smyčka, která je vystavena na povrchu proteinu, narušuje strukturu cílové proteázy, přičemž proteáza je následně degradována (Carrell a Travis, 1985). Příkladem lidského serpinu je antitrombin, mající svojí roli v regulaci krevního srážení.

**6.1. Inhibitory Kunitz typu** jsou reverzibilní kompetitivní inhibitory serinových proteáz (Ascenzi a kol., 2003). Vyznačují se vysokým obsahem disulfidických můstků (Richardson, 1981), které zajišťují proteinům dostatečnou stabilitu (Read a James, 1986). Dalším znakem těchto domén je reaktivní smyčka- tzv. RSL („reactive-site loop“), zasouvající se do aktivního centra proteinázy (Bode a Huber, 2000; Perona a Craik, 1997). Domény byly popsány ve slinách klíšťat, klíšťáků (Corral-Rodriguez a kol., 2009; Francischetti a kol., 2009) a některých lidských proteinů. Jsou to např. základní inhibitor pankreatické trypsinu, BPTI nebo inhibitor tkáňového faktoru – TFPI.

**6.2. Inhibitory Kazal typu** jsou charakterizovány podle evolučně konzervované sekvence aminokyselin, obsahující tři disulfidické můstky a působí s různou specifitou na serinové proteázy (Laskowski a kol., 1980). Existují 2 typy kazal domén: Kazal I a Kazal II. Ve struktuře domén Kazal I se objevuje velké množství opakujících se krátkých alfa helixů a anti-paralelních beta listů (Williamson a kol., 1984), zatímco v doméně II se vyskytuje centrální alfa-šroubovice, krátké dvě antiparalelní beta-listy a několik sulfidických můstků (Schlott a kol., 2002; Stubbs a kol., 1997; van de Locht a kol., 1995). Amino-terminální sekvence této domény se váže do aktivního místa cílových proteáz, čímž brání jejich funkci.

U lidí existuje skupina lymfo-epiteliálních inhibitorů Kazal typu (LEKTI), která hraje roli v morfogenezi kůže a vlasů nebo v protizánětlivé a antimikrobiální ochraně epiteliální sliznice (Furio a kol., 2011). Např. LEKTI-2 je inhibitor molekuly KLK5 (Kallikrein-peptidáza-5), což je serinová proteáza v epidermis, odpovědná za regulaci kožní hemostázy a odlupování kůže. Kromě lidských proteinů byly molekuly Kazal typu popsány také u Heteroptera a Diptera.

### **6.3. Metody k posouzení koagulační aktivity enzymů a inhibitorů**

Metody založené na chromogenních substrátech jsou schopné odhalit aktivitu jednotlivých složek koagulačního systému (enzym, inhibitor) bez návaznosti na ostatní složky tohoto systému.

#### **6.3.1. Metody s chromogenními a fluorescenčními substráty**

Postupy využívající chromogenní substráty se používají hlavně ke zjištění funkčnosti serinových proteáz. Mezi přednosti patří snadné, jednoduché a přesné stanovení. K určení je možné použít větší ředění vzorku. Zjišťuje se schopnost katalytického místa serinové proteázy proteolyticky štěpit předem definovaný substrát na produkt.

Syntetické chromogenní substráty se začaly používat k posouzení aktivity některých enzymů a inhibitorů, u kterých není možné zavést jednoduché koagulační testy (např. stanovení faktoru XIII) nebo byla obtížná standardizace pro jejich snadné ovlivnění řadou dalších faktorů (např. antitrombinem) (Pecka, 2004).

## 6.4. Koagulační testy

Kvalita koagulace je vyjádřena časem potřebným k vytvoření fibrinového vlákna po přidání startovací reagensie a je ovlivněna souhrou prokoagulačních a protikoagulačních plazmatických složek.

Mezi základní koagulační testy, umožňující detekovat poruchu vnitřní či vnější koagulační kaskády, patří aktivovaný parciální tromboplastinový čas, protrombinový čas a trombinový čas.

### 6.4.1. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT, z angl. activated partial thromboplastine time)

Tento test sleduje aktivitu vnitřní koagulační dráhy a přeměnu protrombinu na trombin (Proctor a Rapaport, 1961). Zachycuje tyto složky koagulačního systému: faktory II, V, VIII, IX, X, XI, XII, fibrinogen, prekalikrein a HMWK (high molecular weight kininogen). Do plazmy je přidáván kaolín a fosfolipid (kefalinový komplex neboli parciální tromboplastin). Kaolín působí jako povrchový aktivátor, na němž se aktivují faktory vnitřní cesty (XII a XI) a fosfolipid je nutný k aktivaci faktoru X. Tímto se aktivuje vnitřní a poté i společná cesta. Měří se čas do vzniku fibrinové sraženiny. Za normálních podmínek se tato doba pohybuje mezi 35-45 s. Prodloužení aPTT může způsobit deficit některého z vnitřních faktorů (VIII, IX, XI, XII), deficit více faktorů vnitřní cesty (např. při diseminované intravaskulární koagulaci) nebo deficit faktorů V, X, protrombinu a fibrinogenu (kdy je ovšem současně prodloužený PT). Dále může prodloužení způsobit přítomnost inhibitorů zmíněných koagulačních faktorů.

### 6.4.2. Protrombinový - Quickův čas (PT)

Test protrombinového času slouží k detekci vnější koagulační cesty (Quick, 1935). Sleduje správnou funkci koagulačních faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu. Normální hodnota protrombinového testu je obvykle 12–15 sekund. Protrombinový čas se často vyšetřuje společně s testem aPTT, který monitoruje vnitřní systém hemokoagulace. Test se provádí přidáním tkáňového faktoru a vápníku k plazmě a měří se čas, který je potřebný k vytvoření sraženiny. S prodloužením PT se setkáváme u pacientů s deficitem faktoru VII (velmi vzácný), faktorů V, X, protrombinu, fibrinogenu, z nedostatku vitamínu K či v přítomnosti některých inhibitorů koagulačních faktorů.

### **6.4.3. Trombinový čas (TT)**

Trombinový test (Jim, 1957) postihuje třetí fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem. Přidáním enzymu trombinu k testované plazmě dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin. Fyziologický čas je 14-16 s. Prodloužení časů je nejčastější u kvalitativních a kvantitativních poruch fibrinogenu, u poruchy štěpení fibrinogenu trombinem či v přítomnosti heparinu. Stejně jako u ostatních koagulačních testů i tady lze prodloužení dosáhnout výskytem inhibitorů koagulačních faktorů.

## **7. Antikoagulační faktory vybraných skupin hematofágů**

### **7.1. Helminti**

Helminti tvoří velmi rozsáhlou a různorodou skupinu živočichů, zahrnující několik kmenů. Hematofágní zástupci se objevují u většiny z nich. Mezi hlístice spadá např. významná krevsající čeleď Ancylostomatidae, u ploštěnců bychom našli hematofágy u některých čeledí motolic nebo u Monogenea. Přítomnost a charakter antikoagulačních faktorů u jednotlivých skupin budou popsány v následujících podkapitolách.

#### **7.1.1. Trematoda**

Motolice jsou početná skupina ve většině případů endoparaziticky žijících ploštěnců. Parazitují především v trávicí soustavě, ale mohli bychom je najít např. i v dýchací či nervové soustavě. V krevním řečišti bylo objeveno také několik zástupců, přičemž ty nejvýznamnější pocházejí z čeledi Schistosomatidae.

##### **7.1.1.1. Čeleď Schistosomatidae**

Schistosomy jsou hematofágní motolice žijící většinou v krvi v cévách hostitele. K tomu, aby mohly takto přežívat, musí produkovat molekuly, modulující imunitní a hemostatické odpovědi hostitele ve svůj vlastní prospěch (Pearce a kol., 2002, Mountford a Secor, 2005; Ramajo-Hernández a kol., 2007; Escudero a kol., 2010). Dosud byly identifikovány u schistosom pouze dva typy molekul s antikoagulační aktivitou.



## Annexiny

Annexiny jsou rozpustné bílkoviny v cytosolu i v extracelulárních tekutinách. Spojením s membránami na povrchu buněk se zapojují do procesů hemostázy a protizánětlivých funkcí. Objevují se u živočichů i rostlin (Donnelly a kol., 1997).

V tegumentu a sekrečních produktech schistosom byly identifikovány annexiny s antikoagulační aktivitou (Torre-Escudero a kol., 2011), patřící do evolučně konzervované multigenové rodiny. Tegument schistosom představuje důležitou roli při interakci s hostitelskou imunitou a hemostázou (Jones a kol., 2004; van Hellemond a kol., 2006; Ramajo-Hernández a kol., 2007; Torre-Escudero a kol., 2010). Annexiny jsou exprimovány na povrchu tegumentu dospělých červů i schistosomul, kde jsou v přímém kontaktu s krví hostitele (Tararam a kol., 2010).

V přítomnosti vápníku se annexiny kompetitivně vážou na negativně nabité fosfolipidy a inhibují tak aktivované koagulační komplexy, které jsou na fosfolipidech závislé (Gerke a Moss, 2002). Vazebná místa pro extracelulární annexiny jsou na povrchu buněk.

Annexiny byly identifikovány na povrchu tegumentu u *Schistosoma mansoni* (Braschi a Wilson, 2006; Borges a kol., 2011) a *Schistosoma japonicum* (Mulvenna a kol., 2010). V sekrečních produktech byl izolován annexin SbANX z *Schistosoma bovis*, vykazující inhibiční efekt vůči vnější i vnitřní koagulační dráze (Pérez-Sánchez a kol., 2006).

## Antigen Sm22.6

Antigen 22.6 byl identifikován v tegumentu *Schistosoma mansoni* (Sm22.6 Ag) během 24 hodin po transformaci cercárie ve schistosomulu (Stein a kol., 1986), v období, ve kterém nedochází k buněčnému dělení. Protein byl později nalezen ve všech infekčních stádiích schistosomy, což naznačuje tomu, že může mít zásadní význam pro fyziologickou rezistenci helminta (Samuelson a kol., 1982; Jeffs a kol., Dunne a kol., 1997). Tento antigen je homogenní polymer s inhibiční aktivitou proti lidskému trombinu. Reverzní interakcí antigenu s trombinem dochází k inhibici jeho proteolytické aktivity. Sm22.6 Ag se skládá ze 190 aminokyselinových zbytků a jeho molekulová hmotnost je 22,6 kDa. Přítomnost Sm22.6 antigenu prodlužuje dobu srážení 3-5 krát, což může hrát roli v imunitním úniku parazita (Lin a He, 2006). Antigen 22.6 je považován za významného kandidáta na vakcínu proti schistosomám (Su a kol., 1999; Wu a kol., 1999; Hu a kol., 2001).

### 7.1.2. Nematoda

Hlístice jsou jednou z nejpočetnějších skupin živočichů. Zahrnují druhy parazitující na obratlovcích, bezobratlých, rostlinách i volně žijící. Převážná většina parazitických zástupců žije v trávicím traktu obratlovců, kde se živí tráveninou či krví.

#### 7.1.2.1. Čeleď Ancylostomatidae

Zástupci této parazitické skupiny žijí v tenkém střevě savců. Svou ústní kapsulou rozrušují střevní sliznici. Pokud je infekce rozsáhlá, může následná ztráta krve způsobit krevní anémii z nedostatku železa. Odhaduje se, že asi 600 milionů lidí na světě je infikováno měchovcem (de Silva a kol., 2003; Hotez a kol., 2006). U lidí je infekce nejčastěji způsobená druhy *Ancylostoma duodenale* a *Necator americanus*.

Anti-trombické látky, vylučované měchovci, představují potenciální cíle pro rozvoj preventivní nebo léčebné vakcíny proti infekci měchovcem (Cappello a kol., 1995, 2003; Stassens a kol., 1996).

#### Antikoagulační proteiny NAPs

Skupina peptidů NAPs (Nematode Anticoagulant Proteins) spadá do skupiny hlavních antihemostatických molekul, které byly nalezeny v měchovcích. Každý z těchto NAPs proteinů patří mezi inhibitory serinových proteáz. Do dnešní doby byly izolovány a charakterizovány molekuly rodiny NAPs z měchovce *Ancylostoma caninum* (Cappello a kol., 1996; Stassens a kol., 1996; Harrison a kol., 2001; Li a kol., 2010), *Ancylostoma ceylanicum* (Harrison a kol., 2002; Mieszczanek, 2004) či z *Ancylostoma duodenale* (Gan a kol., 1976-80).

Z lidského druhu *A. duodenale* byl izolován antikoagulant AduNAP4. Obsahuje 104 aminokyselin se 23 zbytkovými signálními peptidy. Velice efektivně prodlužuje aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) a zároveň inhibuje katalytickou činnost faktorů Xa a XIa. Inhibice faktoru Xa funguje jako smíšená inhibice, kdežto inhibitor faktoru XIa jako kompetitivní inhibice. Inhibiční efekt proti trombinu nebyl prokázán.

Antikoagulant NAP5 z *A. caninum* se váže do aktivního místa fXa a tím inhibuje jeho amidolytickou aktivitu. C-terminální konec interaguje s „exosite“ fXa, čímž inhibuje tvorbu trombinu (Rios - Steiner a kol., 2007).

Antikoagulant Ac-AP-12 z *Ancylostoma caninum* byl první inhibitor faktoru Xa izolovaný z esofageálních žláz (Thorson a kol., 1956). Vykazuje až 69% homologní

aminokyselinové sekvence s proteiny skupiny NAPs (Harrison a kol., 2002). Obsahuje 10 cysteinových zbytků, které jsou důležité pro tvorbu 5 disulfidických můstků. Ty zachovávají terciární strukturu a funkce proteinu (Grasberger a kol., 1994; Huang a kol., 1994; Bernard a kol., 1993).

Další antikoagulant z *Ancylostoma caninum* AcAPc2 inhibuje komplex VIIa/TF a protrombinázu (Bergum a kol., 2001; Buddai a kol., 2002). Prodlužuje PT i aPTT a spadá mezi serpiny (Bernard a kol., 1993; Stassens a kol., 1996; Harrison a kol., 2002).

Druh	Antikoagulant	Lokalizace	Inhibice	Reference
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	AceAP-1	Neidentif.	fVII/TF, fXa	Harrison; Mieszczanek, 2004
<i>Ancylostoma caninum</i>	AcAP-12	Esofageální žlázy	fXa	Jiang a kol., 2010
<i>Ancylostoma caninum</i>	AcAP-5,6	Amphidialní/Cephalické žlázy	fXa	Cappello,1995; Strassens,1996
<i>Ancylostoma duodenale</i>	AduNAP-4	Neidentif.	fXa, fXIa	Gan a kol., 1976-1980
<i>Ancylostoma caninum</i>	AcAP-2,3,4	Esofageální žlázy	fVII/TF, fXa	Strassens,1996; Mieszczanek,2004
<i>Ancylostoma caninum</i>	AcaNAP-10,11	Neidentif.	fVIIa/TF, fXIa	Li a kol., 2010

- **Tab.1.** Přehled známých NAPs z různých druhů měchovců (upraveno dle Jiang a kol. – Molecular & Biochemical Parasitology, 2011).

#### 7.1.2.2. Čeleď: Trichostrongylidae

*Haemonchus contortus* je významná patogenní parazitická hlístice, která výrazně ovlivňuje trávicí trakt přežvýkavců, zejména ovcí, koz a skotu, v různých oblastech světa (Meeusen a kol., 2005). Červi sají krev ve slezu, čímž mohou způsobit lokální poškození, chudokrevnost, ztrátu tělesné hmotnosti a špatnou kondici zvířat (Bakker a kol. 2004; Muleke a kol., 2006, 2007). Konečný výsledek může být smrt (White a kol., 2001).

Přítomnost antikoagulační aktivity nebyla u této hlístice intenzivně zkoumána. Jako efektivní inhibitor trypsinu s antikoagulační aktivitou se ukázal být HC-Serpin (*Haemonchus*

*contortus* serpin). Byl lokalizován v epiteliálních buňkách gastrointestinálního traktu pouze u dospělců *H. contortus*, což naznačuje souvislost serpinu s trávením krve (Yi a kol., 2010).

## 7.2. Hirudinea

U pijavek se vyvinul velký arzenál vysoce specifických inhibitorů, působících během sání na hostiteli v různých bodech koagulační kaskády.

### Inhibice trombinu

Mezi nejznámější antikoagulanty, které byly z pijavek izolovány, patří bezpochyby hirudin ze slinných žláz *Hirudo medicinalis*. Řadí se mezi nejúčinnější inhibitory trombinu. Hirudin byl charakterizován jako 7 kDa velký jednořetězcový polypeptid složený z 65 aminokyselin, třech disulfidických můstků uvnitř řetězce, se sulfatovanými tyrosinovými zbytky a 6 cysteiny (Markwardt a kol., 1959; 1960; 1987 a 1989 v Harvey, 1985). Díky přítomnosti 3 disulfidických můstků je jeho N-termiální konec velmi kompaktní. Naproti tomu C-terminální konec obsahuje četné negativně nabitě aminokyselinové zbytky. Ve srovnání s nízkomolekulárním heparinem se hirudin těsně váže na trombin (Talbot, 1989) a pro svou aktivitu nepotřebuje kofaktor. Ve vytvořeném komplexu hirudin/trombin se N-terminální doména hirudinu váže v blízkosti aktivní strany trombinu, zatímco C-terminální doména se váže na vazebné místo fibrinogenu (Naski a kol., 1990). Podrobnější studie krystalické struktury hirudinu ukázaly, že posledních 10 aminokyselinových zbytků (55-65) C-terminální oblasti reaguje s vnější stranou trombinu a právě tato oblast je důležitá pro vazbu fibrinogenu (De Filippis a kol., 1995). Aminokyselinové zbytky na N-konci (1-48) jsou však také důležité pro inhibiční aktivitu hirudinu vůči trombinu (De Filippis a kol., 1995), interagují s jeho katalytickým místem.

Kromě antikoagulantu hirudinu byly izolovány i další inhibitory trombinu různých druhů pijavek. Patří mezi ně granulin z *Hirudo nipponia* (Hong a Kang, 1999), bufrudin z *Hirudinaria manillensis* (Electricwala a kol., 1991), theromin z *Theromyzon tessulatum* (Salzet a kol., 2000) a haemadin z *Haemadipsa sylvestris* (Strube, 1993).

Granulin je 6 kDa velký antikoagulant bohatý na cystein (20%) pocházející z korejské krevsající pijavky *Hirudo nipponia*. Jeho aminokyselinové složení a N-terminální sekvence svou shodně s proteiny granulinového typu, proto název granulin (Hong a Kang, 1999).

Bufrudin je 15,2 kDa velký inhibitor z *H. manillensis*. Nejsilnější inhibiční efekt má na trombin a poté ještě na fVII a fXII. Ve všech koagulačních testech (aPTT, PT a TT) prodlužoval čas srážlivosti.

Po hirudinu, druhý nejsilnější inhibitor - theromin byl izolován ze střeva pijavky *Theromyzon tessulatum*. Je to homodimer tvořený 67 aminokyselinovými zbytky a 16 cysteiny, které jsou zapojeny do 8 disulfidických můstků. Theromin tak patří mezi molekuly bohaté na cysteinové zbytky (Salzet a kol., 2000). Tento antikoagulant však nemá žádnou významnou sekvenční homologii s jiným inhibitory trombinu, které byly dosud izolovány.

Další 5 kDa velký inhibitor trombinu z pijavky *Haemadipsa sylvestris* - haemadin - obsahuje podobně jako hirudin konzervované aminokyselinové zbytky (46-48), které jsou důležité pro vazbu k trombinu (Strube a kol. 1993).

### **Inhibice faktoru Xa**

Inhibice faktoru Xa je u pijavek také rozšířená. Jedná se např. o antistasin ze slinných žláz pijavky *Haementeria officinalis* (Nutt, Gasic, 1988), ghilanthin z *Haementeria ghiliani* (Blankenship a kol., 1990) nebo therostasin, který byl izolován ze slinných žláz *Theromyzon tessulatum*. Struktura therostasinu se skládá z 82 aminokyselinových a 16 cysteinových zbytků a spolu s antistasinem slabě inhibují i trypsin (Chopin a kol., 2000).

Antistasin je těsně se vážající a 15 kDa velký inhibitor fXa získaný z mexické pijavky *H. officinalis*. Protein obsahuje 119 aminokyselinových zbytků rozdělených do tří domén. Reaktivní místo, které se váže do aktivního místa fXa se nachází v doméně I (Nutt a kol., 1991).

Ghilanthin je homologní inhibitor k antistasinu, skládající se z 119 aminokyselin a 20 cysteinů. Navíc ještě obsahuje konsenzuální sekvenci pro vazbu heparinu v C-konci. Reaktivní zbytek (Arginin-34) se váže na aktivní místo fXa a tím dochází k inhibici faktoru (Blankenship a kol., 1990).

Molekula	Druh	Reference
<b>Inhibice trombinu</b>		
Hirudin	<i>Hirudo medicinalis</i>	Markwardt, 1959
Hirustasin	<i>Hirudo medicinalis</i>	Söllner a kol., 1994
Granulin	<i>Hirudo nipponia</i>	Hong a Kang, 1999
Bufrudin	<i>Hirudinaria manillensis</i>	Electricwala, 1991
Haemadin	<i>Haemadipsa sylvestris</i>	Strubea a kol., 1993
Theromin	<i>Theromyzon tessulatum</i>	Salzet a kol., 2000
<b>Inhibice faktoru Xa</b>		
Antistasin	<i>Haemanteria officinalis</i>	Nutt a kol., 1988
Ghilanten	<i>Haementaria ghiliani</i>	Blankeship, 1990
Therostasin	<i>Theromyzon tessulatum</i>	Chopin a kol., 2000

- **Tab. 2.** Molekuly izolované od pijavek podílející se na inhibici koagulační kaskády (upraveno dle Salzet M., 2001).

### 7.3. Arthropoda

Členovci představují nejpočetnější živočišnou říši. Krevsající paraziti, zde zmiňovaní, jsou řazeni do dvou různých skupin – hmyz a roztoči. Mezi hmyz spadají ploštice, vši a dvoukřídli, zatímco klíšťata a klíšťáci patří mezi roztoče.

#### 7.3.1. Ixodida

Tento řád zahrnuje z velké části obligátní parazity, které dělíme na klíšťata a klíšťáky. Stejně jako ostatní hematofágové i Ixodida umí modulovat hemostatický systém. Řada antikoagulantů obsahuje Kunitz domény, které jsou vysoce zastoupeny ve slinných žlázách obou čeledí. Inhibitory Kunitz typu mají za obvyklé cíle serinové proteázy.

##### 7.3.1.1. Čeleď Ixodidae

Klíšťata jsou obligátní ektoparaziti se širokým spektrem hostitelů. Zároveň patří mezi nejvýznamnější vektory účastníci se přenosu lidských onemocnění. Jedná se hlavně o virovou encefalitidu a bakteriální lymfskou boreliózu. Sání klíšťat na hostiteli trvá většinou několik

dní, proto je přítomnost bioaktivních, protizánětlivých a antikoagulačních látek naprosto nezbytná (Ribeiro a kol., 1987).

Inhibitory koagulační kaskády klíšťat patří převážně do proteinové rodiny Kunitz typu nebo do velké skupiny inhibitorů serinových proteáz - serpinů.

## **Inhibice trombinu**

Cílená inhibice trombinu je velmi účinný způsob, jak potlačit hemostatickou reakci. V důsledku toho existuje několik antitrombinů popsanych z různých druhů klíšťat.

Nejnoveji popsany antikoagulant s Kunitz doménou je rhipilin, který byl izolován z *Rhipicephalus haemaphysaloides* (Gao a kol., 2011). Prodlužuje PT i aPTT. Specifičnost rhipilinu ještě není přesně určena. Tím, že zasahuje do vnitřní cesty, však může inhibovat faktor Xa, trombin či oba dva.

Dva inhibitory o velikosti 7 kDa - madanin 1 a 2 byly identifikovány z *Haemaphysalis longicornis* (Iwanaga a kol., 2003). Oba prodlužují aPTT a PT a inhibují přeměnu fibrinogenu na fibrin, aniž by ovlivňovaly amidolytickou aktivitu trombinu. To naznačuje, že se inhibitory váží na „exosite 1“. Jedná se o serpiny s kompetitivní inhibicí. Inhibitory z *H. longicornis* mají jen nepatrné podobnosti s inhibitory jiných druhů klíšťat. Např. chimadanin izolovaný také z *H. longicornis* prodlužuje aPTT a PT, ale na rozdíl od madaninů inhibuje amidolytickou aktivitu trombinu a váže se do jeho aktivního místa (Nakajima a kol., 2006). Další popsany antikoagulant tohoto klíštěte je střevní inhibitor – hemalin, který neblokuje činnost serinových proteáz v místě sání, ale ve střevě, kde pravděpodobně pomáhá i s trávením krve (Liao a kol., 2009).

Microphilin je malý slinný peptid s molekulární velikostí 1,8 kDa izolovaný z *Boophilus microplus* (Ciprandi a kol., 2006). Inhibuje tvorbu fibrinové sraženiny, trombin-indukovanou agregaci krevních destiček, ale amidolytickou aktivitu trombinu nenarušuje. Váže se tedy na „exosite“ trombinu I či II. Další antikoagulanty ze slinných žláz tohoto druhu jsou: 60 kDa velký anti-trombin BmAP (Horn a kol., 2000), který se váže do aktivního místa i „exosite“ trombinu a tím blokuje jeho aktivaci a inhibitor s dvěma Kunitz doménami – boophilin, který není tak specifický. Kromě trombinu působí např. i na faktor VIIa (Macedo-Ribeiro, 2008). Ve střevě *Boophilus microplus* dochází také k inhibici trombinu. Střevní antikoagulant o velikosti 26 kDa inhibuje trombinem indukovanou přeměnu fibrinogenu na fibrin i trombinem indukovanou agregaci krevních destiček bez vazby na trombinovou aktivní stranu. Váže se tedy na jednu z „exosite“ trombinu (Ricci a kol., 2007).

Variegin izolovaný z *Amblyomma variegatum* je jeden z nejmenších přírodních inhibitorů trombinu (32 zbytků). Je to peptid, který se váže na aktivní místo i „exosite“ a i přes svou malou velikost to dělá s velkou afinitou. Aktivní místo trombinu inhibují aminokyselinové zbytky 8-14, zatímco „exosite I“ inhibují zbytky 15-32 (Koh a kol., 2007).

Americanin je další reverzibilní inhibitor trombinu izolovaný z *Amblyomma americanum*. Spadá mezi serpiny a kromě působení na trombin nevykazuje žádné jiné inhibiční aktivity (Zhu a kol., 1997).

Dva inhibitory trombinu NTI-1 a NTI-2 byly izolovány také z nymf *Hyalomma dromedarii* (Ibrahimakol., 2001). Informace o primárních strukturách nejsou k dispozici.

Mezi trombinové inhibitory pocházející z klíšťat patří i dva serpiny z *Ixodes ricinus*. Jedná se o IRIS (*I. ricinus* immuno suppressant) (Prevot a kol., 2006) a IRS-2 (*I. ricinus* serpin - 2) (Chmelař a kol., 2011). Oba serpiny inhibují trombin. IRS-2 inhibuje trombinem indukované srážení krevních destiček a IRIS prodlužuje čas fibrinolýzy či přilnavosti krevních destiček.



<b>Druh</b>	<b>Molekula</b>	<b>Velikost (kDa)</b>	<b>Doména,vazba na trombin, lokalizace</b>	<b>Reference</b>
<b>Inhibice trombinu</b>				
<i>Amblyomma hebraeum</i>	amblin	14	Kunitz,exosite a AS, hemolymfa	Lai a kol., 2004
<i>Boophilus microplus</i>	boophilin	14	Kunitz,exosite a AS, slinné žlázy	Macedo-Ribeiro a kol., 2008
<i>Heamaphysalis longicornis</i>	hemalin	14	Kunitz,exosite a AS,střevo	Liao a kol., 2009
<i>Heamaphysalis longicornis</i>	Madanin 1, 2	7	exosite,slinné žlázy	Iwanaga a kol., 2003
<i>Heamaphysalis longicornis</i>	chimadanin	7	AS, slinné žlázy	Nakajima a kol., 2006
<i>Hyalomma dromedari</i>	NTI-I	3	AS, celé tělo	Ibrahim a kol., 2001
<i>Boophilus microplus</i>	microphilin	1,7	exosite, slinné žlázy	Ciprandi a kol., 2006
<i>Rhipicephalus heamaphysaloides</i>	hipilin	14	Kunitz, slinné žlázy	Gao a kol., 2011
<i>Boophilus microplus</i>	BmAP	60	Exosite, As, slinné žlázy	Horn a kol., 2000
<i>Boophilus microplus</i>	BmGTI	26	Exosite, střevo	Rucci a kol., 2007
<i>Amblyomma variegatum</i>	variegin	3-4	Exosite,slinné žlázy	Koy a kol., 2007
<i>Amblyomma americanum</i>	americanin	12-16	Slinné žlázy	Zhu a kol., 1997
<i>Ixodes ricinus</i>	IRIS	41	Slinné žlázy	Prevot a kol., 2006
<i>Ixodes ricinus</i>	IRS-2	42	Slinné žlázy	Chmelař, 2011

- **Tab.3.** Inhibitory koagulační kaskády ze zástupců Ixodidae (upraveno podle Chmelař a kol., 2011).

## Inhibice faktoru Xa a dalších faktorů

Zajímavá proteinová multigenní rodina, skládající se z desítek homologů, byla objevena zejména u tří druhů rodu *Ixodes*. Tato rodina se označuje jako BTSP (basic tail secreted proteins), protože jejich C-konec se skládá hlavně z lysinu. Do této rodiny patří antikoagulační faktor z *Ixodes scapularis* - Salp14 (salivary protein). Tento protein účinkuje pouze proti faktoru Xa a žádné další proteázy neinhibuje (Narasimhan, 2002). Kromě tohoto faktoru byl u *I. scapularis* objeven ixolaris, který se váže na komplex TF/VIIa a inhibuje tak iniciaci koagulační kaskády (Francischetti a kol., 2002). Obsahuje dvě Kunitz domény a je specifický především pro larvální stádia. Po připevnění larvy k hostiteli rychle poklesla inhibiční aktivita ve žlázách, nejspíše v důsledku sekrece inhibitorů proteáz do hostitele.

Také ze slinných žláz *Rhipicephalus appendiculatus* byl izolován 65 kDa veliký inhibitor serinových proteáz. Je to mírně basický serpin, obsahující disulfidické můstky, které jsou důležité pro jeho aktivitu proti fXa. Působí na jiném místě molekuly než je aktivní místo faktoru Xa (Mulenga a kol., 2002).

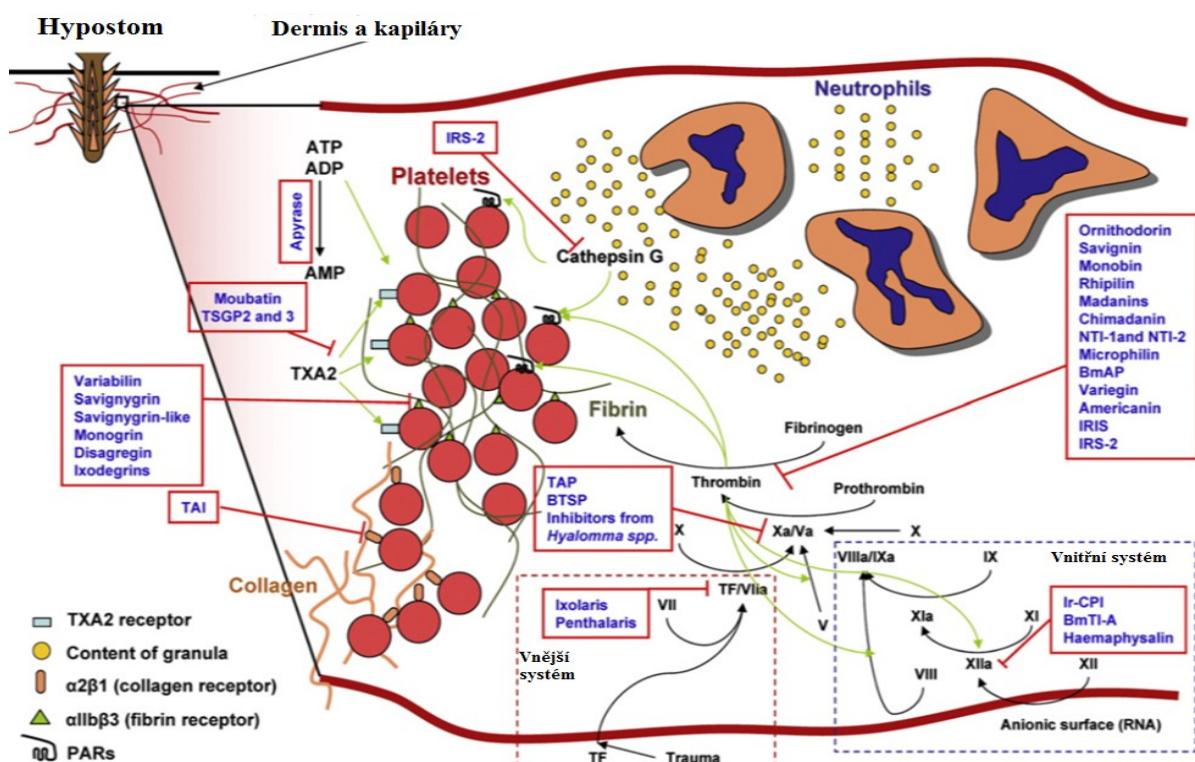
Další antikoagulanty namířené proti faktoru Xa byly izolovány z *Ixodes ricinus* (ixodin), *Hyalomma dromedarii* a *Hyalomma truncatum*. Jejich primární struktura však není objasněna (Joubert a kol., 1995; Ibrahim a kol., 2001). Inhibují vnější i vnitřní koagulační cestu.

Druh	Molekula	Velikost (kDa)	Doména, vazba na trombin, lokalizace	Reference
<b>Inhibice fXa</b>				
<i>Ixodes scapularis</i>	Salp1a	14	BTSP rodina, AS, slinné žlázy	Narasimhan a kol., 2002
<i>Ixodes ricinus</i>	IRIS	41	Slinné žlázy	Prevot a kol., 2006
<b>Inhibice FVIIa/TF</b>				
<i>Ixodes scapularis</i>	ixolaris	14	Kunitz, slinné žlázy	Francischetti a kol., 2002
<b>Inhibice fVII</b>				
<i>Boophilus microplus</i>	boophilin	14	Kunitz, slinné žlázy	Macedo-Ribeiro a kol., 2008

- **Tab.4.** Inhibitory koagulační kaskády izolované ze zástupců Ixodidae (upraveno podle Chmelař a kol., 2011).

### 7.3.1.2. Čeleď Argasidae

Klíšťáci jsou hnízdní paraziti, přičemž jednotlivý zástupci vykazují poměrně velkou hostitelskou specifitu. Tato čeleď zahrnuje 3 hlavní rody: *Argas*, *Ornithodoros* a *Carios*. Rod *Argas* se živí především na ptácích, *Ornithodoros* na savcích a *Carios* na ptácích, netopýrech i savcích (Klompén a kol., 1996; Barker a Murrell, 2004). Na lidech sají jen výjimečně, v nepřítomnosti primárních hostitelů. Na rozdíl od klíšťat, kteří sají hodiny až dny, se klíšťáci zdržují na hostiteli pouze v rozmezí několika minut.



- **Obr.3.** – Schematický přehled hemostatických mechanismů, na které jsou zaměřeny slinné proteiny Ixodida (upraveno dle Chmelař a kol., 2012).

### Inhibice trombinu

Z druhu *Ornithodoros moubata* byl izolován antikoagulant ornithodorin, který obsahuje dvě Kunitz domény a působí proti trombinu (van de Locht a kol., 1996). Nefunguje však na klasickém mechanismu inhibitorů Kunitz typu. Obvykle se reaktivní smyčka (RSL) váže do reaktivního místa trombinu. Ornithodorin do aktivního místa trombinu neváže RSL, nýbrž N-koncové zbytky. C-koncové zbytky se vážou na „exosite 1“, které dále interaguje s fibrinogenem (van de Locht a kol., 1996). Na podobném principu funguje inhibice trombinu i

u dalších zástupců z čeledi Argasidae. Jedná se např. o savignin z *Ornithodoros savignyi* (Nienaber a kol., 1999) nebo monobin z *Argas monolakensis* (Mans a kol., 2008). U antikoagulantu monobinu jde o kompetitivní inhibici. V případě interakce trombin - monobin existují dvě vazebná místa na trombinu (aktivní místo a exosite vázající fibrinogen) a dvě vazebná místa na monobinu (N a C - terminální konce BPTI domény). Dokáže inhibovat vnější (aPTT) i vnitřní cestu (PTT) koagulační kaskády. Antikoagulant monobin je ortolog ornithodorinu a savigninu. Antikoagulační faktory se tedy vyvíjely v rodové linii klíšťáků a zároveň jsou udržovány u druhů klíšťáků dvou různých rodů s odlišnou hostitelskou preferencí (Mans a kol., 2007).

### **Inhibice faktoru Xa**

U *Ornithodoros moubata* existuje kromě ornithodorinu také další antikoagulant Kunitz typu patřící do skupiny TAP (tick anticoagulant peptide) a působící proti faktoru Xa. Dokáže se navázat do aktivního místa faktoru Xa, bez vazby na proenzym X. Aktivní konformace faktoru X je tedy nezbytná k tomu, aby došlo k inhibici. Kinetická analýza prokázala, že TAP se nejprve váže na vnější stranu faktoru Xa a dále pokračuje na jeho aktivní místo. Faktor Xa je inaktivován a koagulační kaskáda se zastavuje. Strukturní podobnosti mezi těmito antikoagulanty však nebyly prokázány. Molekuly mají podobnou pouze inhibiční kinetiku. Tento peptid ze skupiny TAP vykazuje specifickou aktivitu proti fXa a dále již proti žádným jiným enzymům z koagulační kaskády (Gaspar a kol., 1996).

### **7.3.2. Heteroptera**

Mezi ploštice patří parazitičtí i neparazitičtí zástupci. Nejvýznamnější hematofágové patří do čeledí Reduviidae, Cimicidae a Polyctenidae. Rody z čeledi Reduviidae: *Triatoma*, *Rhodnius* a *Panstrongylus* jsou přenašeči prvoka *Trypanosoma cruzi*, který je původcem Chagasovy nemoci. *Rhodnius prolixus* šíří onemocnění především v severní části Jižní Ameriky (Schofield, 1994), *Triatoma infestans* se objevuje v celém jihovýchodním regionu Jižní Ameriky (Forattini a kol., 1982) a *Triatoma brasiliensis* je široce rozšířený v severovýchodní Brazílii (Gonçalves a kol., 2009).

## **Inhibice trombinu**

Antikoagulační aktivita namířená proti trombinu z *Triatoma infestans* byla identifikována ve střevním prostředí. Střevní infestin je protein složený ze sedmi domén Kazal-typu, přičemž domény 1 - 4 mohou inhibovat také faktory XIIa a Xa (Campos a kol., 2002). Inhibiční aktivita této ploštice byla kromě střeva, popsána také ze slinných žláz, s tím, že střevní antikoagulanty mají silnější inhibiční efekt než slinné (Paim a kol., 2010).

Antikoagulant triabin ze slinných žláz *Triatoma pallidipennis* také inhibuje trombin. Antikoagulant je odvozený z lipocalinu (Noeske-Jungblut a kol., 1995). Je to kompaktní molekula o jedné doméně, která se skládá z 142 aminokyselinových zbytků a zároveň obsahuje 8 beta barelů (Fuentes-Prior a kol., 1997). S trombinem tvoří nekovalentní komplex a váže se na jeho povrchu v místě vazby pro fibrinogen.

Prolixin G (rhodniin) je inhibitor trombinu izolovaný ze střeva ploštice *Rhodnius prolixus* a patří do rodiny molekul Kazal-typu.

## **Inhibice dalších faktorů koagulační kaskády**

Slinný antikoagulant z *Rhodnius prolixus* prolixin S je 19,7 kDa velký protein, který obsahuje jednu molekulu nitroforinu, která je nositelem molekuly NO. Inhibuje faktor VIII ve vnitřní cestě koagulační kaskády, který zprostředkovává přeměnu faktoru X na jeho aktivovanou formu Xa. (Ribeiro a kol., 1995; Hellman a kol., 1965).

Antikoagulační aktivita *Triatoma infestans* ze slinných žláz je namířená do dvou míst koagulační kaskády. Inhibuje faktor VIII, čímž zasahuje do vnitřní koagulační dráhy, podobně jako je tomu u zástupce *Rhodnius prolixus* (Hellmann a Hawkins, 1965). Ve společné dráze má nejvýraznější efekt na faktor V, který je strukturálně podobný faktoru VIII (Mann a kol., 1995). Inhibiční aktivita byla potvrzena koagulačními testy, kde došlo k prodloužení trombinového času, protrombinového času i aktivovaného parciálního trombinového času (Pereira a kol., 1996).

U ploštice *Panstrongylus megitus* byla sice přítomnost antikoagulantů prokázána, ovšem nebyla zcela objasněna. Stejně jako ostatní ploštice i tato má antikoagulační aktivitu ve slinných žlázách a střevním prostředí, kde byla identifikována doména Kazal typu (Meiser a kol., 2010). Slinná inhibiční aktivita je namířená do vnitřní dráhy koagulace a potvrzena testy, kde došlo k prodloužení trombinového času a aktivovaného parciálního trombinového času (Pereira a kol., 1996).

### 7.3.3. Diptera

Řád Diptera patří mezi nejpočetnější skupiny hmyzu, a proto není divu, že mezi nimi nacházíme i řadu parazitických druhů. Významnější krevsající čeledi patřící do tohoto řádu jsou Culicidae, Phlebotomidae, Ceratopoginidae, Simuliidae, Tabanidae či Glossinidae. Paraziticky žijí pouze dospělá stádia a ve většině případů pouze samičky. Zástupci patří mezi nebezpečné vektory přenášející závažná infekční onemocnění člověka, hospodářských i volně žijících zvířat.

#### 7.3.3.1. Čeleď Culicidae

Mezi nejpočetnější rody komárů patří *Aedes*, *Culex* a *Anopheles*. Hematofágním způsobem života žijí pouze samičky, které napadají široké spektrum hostitelů. Jejich bodavě sací ústrojí je tvořeno dlouhým tenkým sosákem. Napichují cévy a sají krev hostitele, přičemž nedochází k tvorbě hematomů. Patří tedy do skupiny solenofágních parazitů. Během příjmu krve vylučují řadu antihemostatických molekul, působící proti hemostázi hostitele.

Jsou to nebezpeční vektorů řady onemocnění. Jedná se o žlutou zimnici, která je rozšířená hlavně v Africe a Jižní Americe (*Aedes*), horečku dengue v Africe a tropickém pásu (*Aedes*), West Nile virus (*Culex*) či některé encefalitidy. Z protozoálních onemocnění je nejvýznamnější malárie (*Anopheles*) a z helmintóz lymfatické filariózy (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*).

U rodu *Aedes*, konkrétně ve slinných žlázách samice *Aedes aegypti*, byl identifikován 54 kDa velký antikoagulační faktor působící proti faktoru Xa. Jedná se o reversibilní inhibitor, odpovídající inhibitorům serinovým proteáz Kazal typu (Ribeiro a kol., 2007). Další antikoagulant Kazal typu AaTI (*Aedes aegypti* trombin inhibitor) je inhibitor trombinu. Prodlužuje protrombinový čas (PTT), aPTT i trombinový čas (TT). Inhibice trombinu je nekompetitivní. Antikoagulant AaTI se váže do stejné oblasti trombinu jako antitrombin III nebo heparin, či-li na „exosite II“. Transkript AaTI se kromě slinných žláz objevuje i ve střevě samic, což naznačuje možnou roli střevního antikoagulantu (Watanabe a kol., 2010).

U zástupců rodu *Anopheles* byl dosud objeven jediný antikoagulant, s aktivitou namířenou proti trombinu. Jedná se o monomerní protein izolovaný ze slinných žláz *Anopheles stephensi* o velikosti 45 kDa. Velikostně se řadí mezi jeden z největších antikoagulačních faktorů. Prodlužuje aPTT i PT a dokáže se vázat pouze do aktivního místa trombinu. Mezi inhibitorem a trombinem vzniká nekovalentní reverzibilní interakce (Waidhet-Kouadio a kol., 1998).

### 7.3.3.2 Čeleď Phlebotomidae

Tato čeleď zahrnuje dva důležité rody: *Lutzomyia* (Nový Svět) a *Phlebotomus* (Starý Svět). Řadí se mezi přenašeče prvoků rodu *Leishmania*.

U druhu *Lutzomyia longipalpis*, který je vektorem *Leishmania chagasi* v Novém Světě, bylo popsáno 6 různých antikoagulantů. Tyto inhibitory patří do rodiny lektinů C-typu. Kalcium dependentní (C-type) lektiny sdílejí homologní struktury, které umí s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat cukry, ať už volné nebo vázané na glykoproteinech nebo glykolipidech. Koagulační faktory IX/X a faktor Von Willebrandtův mají vazebné místo pro domény lektinů C-typu, což nasvědčuje tomu, že antikoagulanty *Lutzomyia longipalpis* mohou tyto faktory vázat a tím je inhibovat. Experimentálně však tato hypotéza nebyla potvrzena (Valenzuela kol., 2004).

Nejnovější studie objevily hlavní antikoagulant – lufaxin z *Lutzomyia longipalpis* a *Phlebotomus papatasi*, patřící mezi inhibitory fXa. Inhibitor je 34 kDa velký a obsahuje 8 disulfidických můstků. Jeho vazba na faktor Xa je pevná a reverzibilní. Blokuje katalytickou aktivitu faktoru a připojení protrombinázy. Kromě faktoru Xa neinhibuje žádné další faktory. Pokusy prokázaly silnou inhibici proti tvorbě sraženiny a naopak podporu a prodloužení krvácení. Přítomnost antikoagulantu prodlužuje také koagulační testy PT a aPTT (Collin a kol., 2012).

### 7.3.3.3. Čeleď Ceratopogonidae

Tiplíci jsou vektory řady onemocnění, spíše veterinárního významu. Např. *Culicoides variipennis sonorensis* je primární vektor katarální horečky u ovcí v Severní Americe. Provedené pokusy se slinnými extrakty tohoto tiplíka mají zpomalující efekt na rekalcifikaci plasmy, která neobsahovala trombocyty a zároveň prodlužující efekt na protrombinový čas. Inhibiční aktivita je namířená do vnější koagulační cesty, konkrétně proti katalytické aktivitě faktoru Xa. Inhibicí faktoru Xa nedochází ke štěpení peptidové vazby v protrombinu a faktor II se tak neaktivuje. 28 kDa velký antikoagulant svou inhibicí tedy narušuje koagulační mechanismy na místě, kde se sbíhá vnitřní a vnější cesta kaskády (Yin, 1974). Po nasátí samice se antikoagulační aktivita ve slinách snižuje. Samice během sání své antikoagulační faktory vstříkují do hostitele a přítomnost inhibitorů se tak ve slinných žlázách postupně snižuje.

#### 7.3.3.4. Čeleď Glossinidae

Za zájmem o čeleď Glossinidae stojí fakt, že jsou to vektorů prvoků rodu *Trypanosoma*, kteří jsou původci spavé nemoci u člověka a nagany u dobytka. Jedná se závažná onemocnění ze zdravotnického i veterinárního hlediska.

Studie vedoucí ke zjištění antikoagulační aktivity byly prováděny u druhů *Glossina austeni* (Hawkins, 1996) a *Glossina morsitans* (Parker a Mant, 1981; Cappello, 1996). V obou případech byla ve slinných žlázách prokázána inhibiční aktivita proti trombinu.

Hlavní antikoagulační 32 aminokyselinový peptid ze slinných žláz mouchy *Glossina morsitans* se nazývá TTI (tsetse thrombin inhibitor). TTI je velmi účinný inhibitor, i když jeho molekulární hmotnost je malá: 3,5 kDa. Tento inhibitor je vysoce specifický pro trombin a neobsahuje žádné známé homologní sekvence s jinými přírodními antikoagulanty (Cappello a kol., 1998). Protein inhibuje katalytickou aktivitu trombinu, čímž zabraňuje trombinem indukovanou agregaci krevních destiček (Cappello a kol., 1996).

Pozdější studie, která se zabývala analýzou genů ze slinných žláz *G.morsitans* (Li a kol., 2001) přítomnost hlavního antikoagulantu TTI potvrdila, ale podrobnosti o jeho mechanismu účinku nebyly charakterizovány.

#### 7.3.3.5. Čeleď Simuliidae

Antikoagulační aktivita muchniček, jakožto vektora vlasovce *Onchocerca volvulus*, byla studována již několikrát. Obecně by se dalo říci, že muchničky mají namířenou antikoagulační aktivitu do společné koagulační dráhy, proti faktorům V, Xa a trombinu (Cupp a kol., 1997). Důkazem může být muchnička *Simulium vittatum*, u níž byla slinná antikoagulační aktivita proti těmto faktorům potvrzena (Jacobs a kol., 1990; Abebe a kol., 1994; Abebe a kol., 1995, 1996).

V jiné studii byla porovnávána antikoagulační aktivita slinných žláz 4 různých druhů z rodu *Simulium*: *S. vittatum*, *S. argus*, *S. ochraceum* a *S. metallicum*. Vyšlo najevo, že všechny druhy mají inhibiční aktivitu směřující proti faktoru Xa. Inhibice trombinu byla potvrzena pouze u prvních dvou zmiňovaných (Abebe a kol., 1994; Jacobs a kol., 1990).

Novější publikace popsaly ve slinách *S. vittatum* 2 proteiny Kunitz typu: Sv-66 a Sv-170, které by mohly působit jako antikoagulační faktory (Andersen, 2009). Podrobnější studie prokázala antikoagulační aktivitu pouze u molekuly Sv-66, byla pojmenována simukunin. Je to 9,6 kDa velký protein, který se váže na aktivní místo fXa. Kromě faktoru Xa účinkuje i na další serinovou proteázu fXIa (Tsujimoto a kol., 2012).



Molekula simulidin je další inhibitor popsaný z *S. vittatum*. Jedná se o 11,3 kDa velký a teplotně stabilní anti-trombin bohatý na threonin. N terminální sekvence nevykazuje žádnou podobnost s žádnými dalšími antikoagulanty (Abebe a kol., 1995).

*Simulium guianense* je druh, který patří mezi hlavní vektory onchocerkózy v Brazílii (Medeiros a kol., 2010). Koagulační testy potvrdily, že slinné extrakty prodlužují rekalcifikaci plasmy, PTT i TP (Chagas a kol., 2010). Výzkum, zabývající se studiem slinných žláz, prokázal přítomnost antikoagulačního proteinu Kunitz typu. Až 72% homologních struktur vykazuje s antikoagulačním faktorem *Simulium nigrimanum* a 58% homologních sekvencí s proteiny *S. vittatum*. Antikoagulant *S. guianense* inhibuje jeden z cílů *S. vittatum*, faktor Xa (Chagas a kol., 2011).

Další nově izolovaný peptid z *S. guianense* vyznačuje určité homologie (32%) s kunitoxinem, hadím slinným proteinem bohatým na cystein a fungujícím jako inhibitor serinových proteáz (Fry, 2005). Kunitz domény ovšem obsahuje pouze hadí peptid. Kunitoxin inhibuje trombin, což by nasvědčovalo tomu, že protein z *S. guianense* inhibuje též trombin. Potvrzující studie však nebyla publikována (Chagas a kol., 2011).

#### 7.3.3.6. Čeled' Tabanidae

Tabanidae jsou vektory řady původců lidských i zvířecích nemocí (tularémie, antraxu či některých filárií). Samice ovádů dokáží nasát i více než 200 mg krve, takže přítomnost účinných antikoagulačních molekul je nezbytná.

U studovaného druhu *Tabanus yao* byla identifikována a charakterizována přítomnost tabkuninu - inhibitora serinové proteázy ze slinných žláz. Je to protein 6 kDa velký, složený z 76 aminokyselin a obsahující konzervovanou Kunitz doménu. Sdílí určité podobnosti se serpiny klíšťat, jako jsou boophilin (Lai a kol., 2004), ixolaris-2 nebo scapularis-S (Francischetti a kol., 2002). Tabkunin inhibuje hydrolytickou aktivitu trombinu. Antikoagulační aktivita byla potvrzena koagulačním protrombinovým testem (Xu a kol., 2008).

Další studie, zabývající se antikoagulační aktivitou Tabaniae, prováděla pokusy na 6 rodech: *Atylotus*, *Chrysops*, *Haematopota*, *Heptatoma*, *Hybomitra* a *Tabanus*. Pomocí standartních koagulačních testů (TT, PT a aPTT) byla prokázána silná inhibiční aktivita proti trombinu u všech rodů, kromě rodu *Chrysops*. Inhibice fXa nebyla identifikována. Následně byla antikoagulační aktivita srovnávána mezi 19 druhy těchto rodů, přičemž vyšlo najevo, že nejsilnější antikoagulanty obsahují slinné žlázy *Heptatoma pellucens* a *Tabanus bovinus*, nejnížší pak u *Chrysops viduatus* (Kazimírová a kol., 2002). Inhibitor trombinu, 7 kDa velký,

z *Tabanus bovis* byl již dříve pojmenován jako tabanin (Markwardt a Leberecht, 1959; Markwardt a Schulz, 1960).

#### 7.3.3.7. Čeleď Muscidae

Moucha *Haematobia irritans* je hlavním celosvětově rozšířeným parazitem skotu. Od ostatních dvoukřídlých se liší v tom, že krev je primárním zdrojem výživy pro obě pohlaví. Antikoagulační aktivita *Haematobia irritans* byla identifikována ve slinných žlázách. Jedná se o 16,7 kDa velký protein trombostasin (TS) s anti-trombickou aktivitou. Skládá se z 81 aminokyselin a strukturně nevykazuje žádné podobnosti s jinými hmyzími inhibitory trombinu. TS se nekovalentně váže do aktivního místa trombinu, čímž výrazně snižuje jeho amidolytickou aktivitu a nedochází tak ke štěpení fibrinogenu. Trombostasin může také narušit „exosite“ trombinu - vazebné místo pro fibrinogen (Zhang a kol, 2001).

#### 7.3.4. Anoplura

Vši jsou permanentní parazitické organismy, které cizopasí výhradně na savcích. Proboscis mají velmi úzký (Tawfik, 1968), proto jejich slinné antiagregační a antikoagulační proteiny musejí mít silný účinek pro překonání hostitelských hemostatických mechanismů.

Ve slinách *Pediculus humanus humanus* byla objevena antikoagulační aktivita namířená proti trombinu a faktoru Xa. Inhibice trombinu byla potvrzena testem, kde extrakty ze slin inhibovaly trombinový čas. Molekulární hmotnost tohoto proteinu je 7 kDa. Druhý identifikovaný antikoagulant je inhibitor faktoru Xa a vykazuje mnohem nižší účinnost inhibice než anti-trombin. Přesný mechanismus účinku a struktura proteinů není podrobněji charakterizována (Mumcuoglu a kol., 1995).

### 8. Závěr

Hematofágie je rozšířená především mezi skupinami členovců, helmintů a pijavek. Zástupci sající krev jsou často spjati s přenosem nebezpečných patogenů. Nejčastěji jsou to patogeny virového a bakteriálního původu, prvoci či helminti. I když se jedná o druhy, které nic nepřenášejí, mohou svému hostiteli způsobit řadu jiných nepříjemností, méně či více závažných. Od nejrůznějších zánětů, vyrážek, až po vnitřní krvácení. Důležitý je proto způsob parazitace a místo sání.

U všech těchto hematofágních parazitů produkují specializované žlázy antikoagulační faktory, zastavující proces srážení krve. V nejběžnějším případě jde o slinné žlázy, ale

například u hlistice čeledi Ancylostomatidae byla zjištěna inhibiční aktivita v esofageálních žlázách. Antikoagulační faktory inhibují jednotlivé faktory koagulační kaskády, které až na výjimky spadají do skupiny serinových proteáz. Napříč všemi hematofágními skupinami, příbuznými i nepříbuznými, se jedná nejčastěji o inhibici faktorů IIa (trombin) a Xa.

U krevsajících motolic Schistosomatidae byla popsána antikoagulační aktivita v tegumentu. Inhibice je zprostředkována annexiny, zasahující do vnitřní i vnější koagulační cesty a konkrétním antigenem (Sm22.6 Ag) s anti-trombickou inhibiční aktivitou. U pijavek Hirudinea se v zásadě jedná jen o inhibici trombinu a faktoru Xa, alespoň co se týče již popsaných antikoagulantů. U čeledi Ancylostomatidae se vyskytují proteiny, spadající do skupiny peptidů NAPs s převládajícím antikoagulačním účinkem proti faktoru Xa a v menší míře i proti faktoru fXIa nebo komplexu fVII/TF. Žádný inhibitor trombinu u nich nebyl do této doby popsán. Pro klíšťata a klíšťáky jsou typické inhibitory serinových proteáz Kunitz typu. U klíšťáků Argasidae se jedná především o inhibitory trombinu, fXa a v menší míře i komplexu fVII/TF. Tyto antikoagulanty byly popsány ve slinných žlázách i střevním prostředí. U klíšťat se objevuje kromě molekul Kunitz typu ještě jedna velká rodina inhibitorů serinových proteáz pojmenovaná serpiny. Podobně jako u klíšťáků převládá inhibice trombinu a fXa. Pro antikoagulační faktory ploštic (Heteroptera) je typická doména Kazal typu, která byla popsána také u skupiny dvoukřídlých (Diptera). U zástupců ploštic je přítomna mimo slinné i střevní antikoagulační aktivita. V této skupině dochází kromě trombinu také k inhibici faktorů VII a VIII. U jednotlivých čeledí řádu Diptera se střídavě opakují inhibice trombinu a fXa.

Antikoagulační aktivita není ještě zdaleka popsána u všech skupin a jejich zástupců. K postupné izolaci a identifikaci nejen antikoagulačních molekul napomáhají technologie a přístupy zejména v oblasti molekulární biologie a biochemie. Sekvence molekul, cDNA knihovna uchovávající kompletní sekvence slinných žláz, spojená s proteomikou a funkční genomikou či transkriptomikou vede k objevování nových proteinů a jejich biologických aktivit. Ke zkvalitnění a usnadnění výzkumu napomáhá i samotný rozvoj těchto disciplín. Celkově to přispívá ke zrychlení charakteristiky slinných molekul, což se odráží v rychlejším vývoji nových vakcín. Nebezpečné choroby se tak dostanou snáze pod kontrolu.

Výše zmiňované přístupy přispívají k ucelení informací o antikoagulační aktivitě hematofágů, které nejsou ve většině případů stoprocentní. U řady skupin se nepodařilo zcela objasnit přesný mechanismus účinku či přesné místo vazby inhibitora. Existují skupiny, např. Anoplura, Siphonaptera či některé zástupci řádu z Diptera, u nichž se antikoagulační aktivita předpokládá, ovšem dosud není experimentálně ověřena a popsána.

Další velké vědomostní mezery jsou u některých skupin helmintů. U krevních motolic je toho o antikoagulační aktivitě mimo schistosom známo velmi málo. Např. ve střevě a tegumentu motolice *Fasciola hepatica* byla objevena molekula s Kunitz doménou. Některé její sekvence aminokyselin se shodují s rodinou inhibitorů proteáz – BPTI, ale protein z motolice nevykazuje žádnou inhibiční aktivitu, nebo jen velmi malou. Antikoagulační aktivita se testovala na serinových proteázách, jež patří mezi klíčové faktory koagulační kaskády, na chymotrypsinu či kallikreinu (Bozas a kol., 1995). Otázkou zůstává, zda je antikoagulační aktivita ve střevě *Fasciola hepatica* nezbytná a do současné doby nebyla pouze identifikována nebo si motolice vystačí s hemolytickými proteiny, které pomáhají při trávení krve.

Kromě motolic patří mezi velké neznámé také antikoagulační aktivita zástupců Monogenea, spadající do kmene ploštěnců. Studium antikoagulační aktivity těchto parazitů bude hlavní náplň mé diplomové práce, v níž se pokusím prokázat a charakterizovat přítomnost antikoagulační aktivity této skupiny. S největší pravděpodobností se budou antikoagulační faktory vyskytovat ve střevě či v přídavných žlázách v přední části těla, v prohaptoru.

## 9. Seznam použité literatury

- Abebe M., Cupp M.S., Champagne D., Cupp E.W. 1995. Simulidin: a Black Fly (*Simulium vittatum*) Salivary Gland Protein with Anti-thrombin Activity. *J. Insect Physiol.* pp. 1001-1006.
- Blankenship D.T., Brankamp R.G., Manley G.D., Cardin A.D. 1990. Amino acid sequence of ghilanten: Anticoagulant-antimetastatic principle of the south American leech, *Haemaphysalis ghilianii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 166, Issue 3.
- Bozas S. E., Panaccio M., Creaney J., Dosena M., Parsons J.C., Vlasuk G.V., Walkerc I.D., Spithilla T.W. 1995. Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Volume 74, Issue 1.
- Campos I.T., Amino R., Sampaio C.A.M., Auerswald E. A., Friedrich T., Lemaire H.G., Schenkman S., Tanaka A.S. 2002. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 991–997.
- Campos Ch.A., Medeiros J.F., Filho S.A., Daniel V. 2010. Anticoagulant activity in salivary gland homogenates of *Thysopelma guianense* (Diptera: Simuliidae), the primary vector of onchocerciasis in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 105(1): 174-178.
- Cappello M., Li S., CHen X., CHang-Ben Li, Harrison L., Narashimhan S., Beard Ch.B., Aksoy S. 1998. Tsetse thrombin inhibitor: Bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 14290–14295.
- Ciprandia A., Kobe de Oliveira S., Masudaa A., Hornd F., Termignoni C. 2006. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*. Volume 114, Issue 1.
- Collin N., Assumpcao T., 1, Mizzurini D., Monteiro R., Valenzuela J., Francischetti I. 2012. A Novel Family of Factor Xa Inhibitors from the Salivary Gland of Sandfly Vector of Leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*. *Toxicon* 60: 95–248.
- Chagas A. C., Calvo E., Pimenta P., Ribeiro J. 2011. An insight into the sialome of *Simulium guianense* (DIPTERA:SIMULIIDAE), the main vector of River Blindness Disease in Brazil. *BMC Genomics* 2011, 12: 612.
- Cupp E.W., Cupp M.S. 1997. Black fly (Diptera:Simuliidae) salivary secretions: importance in vector competence and disease. *J Med Entomol.*, 34(2): 87-94.
- De Filippis V., Vindigni A., Altichieri L., Fontana A. 1995. Core domain of hirudin from the leech *Hirudinaria manillensis*: chemical synthesis, purification, and characterization of a Trp3 analog of fragment 1-47. *Biochemistry*, 34(29): 9552-64.
- Deng L., He Q., Kang T., Yin H., Jin X., Li H., Gan W., Yang CH., Hua J., Wua Y., Peng L. 2010. Identification of an anticoagulant peptide that inhibits both fXIa and fVIIa/tissue factor from the blood-feeding nematode *Ancylostoma caninum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392: 155–159.
- Electricwala A., Sawyer R.T., Jones C.P., Atkinson T., 1991. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, Volume 2, Issue 1, pp. 83–89.
- Francischetti I.M., Valenzuela J.G., Andersen J.F., Mather T.N., Ribeiro J.M., 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 99(10): 3602-12.
- Gao X., Shi L., Zhou Y., Cao J., Zhang H., Zhou J. 2011. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *Journal of Insect Physiology*. Volume 57, Issue 2.
- Gan W., Deng L., Yang Ch., He Q., Yin H., Jin X., Lu Ch., Wu Y., Peng L. 2009. An anticoagulant peptide from the human hookworm, *Ancylostoma duodenale* that inhibits coagulation factors Xa and XIa. *FEBS Letters* 583: 1976–1980.

- Harrison L.M., Córdova J.L., Cappello M. 2001. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide-5: immunolocalization and in vitro neutralization of a major hookworm anti-thrombotic. *Mol Biochem Parasitol.* 115(1): 101-7.
- Harvey R.P., Degryse E., Stefani L., Schamber F., Cazenave J.-P., Courtney M., Tolstoshev P., Lecoq J.-P. 1985. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 83, pp. 1084-1088.
- Hellmann K., Hawkins R.I. 1964. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus*. *Nature*, 201: 1008-9.EL
- Hong S. J., Kang K.W. 1999. Purification of Granulin-like Polypeptide from the Blood-Sucking Leech, *Hirudo nipponia*. *Protein Expression and Purification*. Volume 2, Pages 340–346.
- Horn F., dos Santos P.C., Termignoni C. 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch Biochem Biophys*, 384: 68–73.
- Charlab R., Valenzuela J.G., Rowton E.D., Ribeiro J.M.C. 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *PNAS* 26: 15155–15160.
- Chmelař J., Calvo E., Pedra J.H.F., Francischetti I.M.B., Kotsyfakis M. 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics* 75: 3842-3854.
- Chopin V., Salzter M., Baerti J., Vandenbulcke F., Sautiere P.E., Kerckaert J.P., Malecha J. 2000. Therostasin, a Novel Clotting Factor Xa Inhibitor from the Rhynchobdellid Leech, *Theromyzon tessulatum*. *The Journal of biological chemistry*, pp. 32701-32707.
- Ibrahim M.A., Ghazy A.H.M., Maharem T.M., Khalil M.I. 2001. Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130: 501-512.
- Iwanaga S., Okada M., Isawa H., Morita A., Yuda M., Chinzei Y. 2003. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur. J. Biochem.* 270: 1926–1934.
- Jacobs J.W., Cupp E.W., Sardana M., Friedman P.A. 1900. Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. *Thromb Haemost*, 64(2): 235-8.
- Jiang D., Zhan B., Mayor R.S., Gillespie P., Keegan B., Bottazzi M.E., Hotez P. 2011. Ac-AP-12, a novel factor Xa anticoagulant peptide from the esophageal glands of adult *Ancylostoma caninum*. *Molecular & Biochemical Parasitology* – 10533.
- Joubert A.M., Crause J.C., Gaspar A.R., Clarke F.C., Spickett A.M., Neitz A.W. 1995. Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. *Exp Appl Acarol.*, 19(2): 79-92.
- Kazimirová M., Šulanová M., Trimmell A.R., Kozánek M., Vidlička L., Labuda M., Nuttall P.A. 2002. Anticoagulant activities in salivary glands of tabanid flies. *Medical and veterinary entomology* 16: 301-309.
- Koh Ch., Kazimirova M., Trimmell A., Takac P., Labuda M., Nuttall P., Kini R. 2007. Variegin, a Novel Fast and Tight Binding Thrombin Inhibitor from the Tropical Bont Tick. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 282, NO. 40, pp. 29101–29113.
- Lai R., Takeuchi H., Jonczyk J., Reesa H.H., Turner P.C. 2004. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene*. Volume 342, Issue 2.
- Liao M., Zhou J., Gong H., Boldbaatar D., Shirafujia R., Battura B., Nishikawa Y., Fujisaki K. 2009. Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology*, Volume 55, Issue 2.
- Li S., Kwon J., Aksoy S. 2001. Characterization of genes expressed in the salivary glands of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Molecular Biology* 10(1): 69–76.

- Lin Ya-Ling, He S. 2006. Sm22.6 antigen is an inhibitor to human thrombin. *Molecular & Biochemical Parasitology* 147: 95–100.
- Li D., He Q., Kang T., Yin H., Jin X., Li H., Gan W., Yang C., Hu J., Wu Y., Peng L. 2010. Identification of an anticoagulant peptide that inhibits both fXIa and fVIIa/tissue factor from the blood-feeding nematode *Ancylostoma caninum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 392(2): 155-9.
- Macedo-Ribeiro S., Almeida C., Calisto B.M., Friedrich T., Mentele R., Stürzebecher J., Fuentes-Prior P., Pereira P.J. 2008. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One*, 3(2): e1624.
- Mans J. Ben, Andersena J.F., Schwan Tom, Ribeiro J.M.C. 2007. Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: Implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 22–41.
- Mieszczanek J., Harrison L.M., Vlasuk G.P., Cappello M. 2004. Anticoagulant peptides from *Ancylostoma caninum* are immunologically distinct and localize to separate structures within the adult hookworm. *Molecular & Biochemical Parasitology* 133: 319–323.
- Mieszczanek J., Harrison L.M., Cappello M. 2004. *Ancylostoma ceylanicum* anticoagulant peptide-1: role of the predicted reactive site amino acid in mediating inhibition of coagulation factors Xa and VIIa. *Molecular & Biochemical Parasitology* 137: 151–159.
- Meisera Ch. K., Piechurab H., Wernera T., Dittmeyer-Schäfera S., Meyerb H.E., Warscheidb B., Schaub G.A., Balczun C. 2010. Kazal-type inhibitors in the stomach of *Panstrongylus megistus* (Triatominae, Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 40, Issue 4.
- Mulenga A., Tsuda A., Onuma M, Sugimoto C. 2003. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 267–276.
- Mumcuoglu K.Y., Galun R., Kaminchik Y., Panet A., Levanon A. 1995. Antihemostatic Activity in Salivary Glands of the Human Body Louse, *Pediculus humanus humanus* (Anoplura: Pediculidae). *J. insect Physiol.* pp. 1083-1087.
- Nakajima C., Imamura S., Konnai S., Yamada S., Nishikado H., Ohashi K., Onuma M. 2006. A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from *Haemaphysalis longicornis* salivary gland. *J Vet Med Sci.*, 68(5): 447-52.
- Narasimhan S., Koski R.A., Beaulieu B., Anderson J.F., Ramamoorthi N., Kantor F., Cappello M., Fikrig E. 2002. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol Biol.*, 11(6):641-50.
- Naski M.C., Fenton J.W., Maraganore J.M., Olson S.T., Shafer J.A. 1990. The COOH-terminal domain of hirudin. An exosite-directed competitive inhibitor of the action of alpha-thrombin on fibrinogen. *J Biol Chem*, 265(23): 13484-9.
- Noeske-Jungblut C., Haendler B., Donner P., Alagon A., Possani L., Schleuning W.D. 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem.*, 270(48): 28629-34.
- Nutt M.E., Jain D., Lenny B.A., Schaffer L., Siegl P.K., Dunwiddie Ch., T. 1991. Purification and characterization of recombinant antistasin: A leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 285, Issue 1.
- Paim R.R.M., Araújo R.N., Soares A.C., Dhom Lemos L., Tanaka A.S., Gontijo N.F., Lehane M.J., Pereira M.H., 2010. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *International Journal for Parasitology* 41: 765–773.
- Parker K.R., Mant M.J. 1979. Effects of tsetse (*Glossina morsitans morsitans* Westw.) (Diptera: Glossinidae) salivary gland homogenate on coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.*, 42(2): 743-51.

- Pecka M. Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patologie hemostázy. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-00-5.
- Pereira M.H., Souza M.E.L., Vargas A.P., Martins M.S., Penido C.M., Diotaiuti L. 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Tropica*, 61: 255-261.
- Pe´rez de Leo´n, Valenzuela J.G., Tabachnick W.J. 1998. Anticoagulant Activity in Salivary Glands of the Insect Vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an Inhibitor of Factor Xa. *Experimental parasitology* 88: 121–130.
- Pérez-Sánchez R., Ramajo-Hernández A., Ramajo-Martín V., Oleaga A. 2006. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics*, 1: S226-36.
- Prevot P.P., Couvreur B., Denis V., Brossard M., Vanhamme L., Godfroid E. 2007. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, Volume 25, Issue 17.
- Rahn D. W. 1991. Lyme disease: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. Volume 20, Issue 4.
- Richardson J.L., Kröger B., Hoeffken W., Sadler J.E., Pereira P., Huber R., Bode W., Fuentes-Prior P. 2000. Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *The Embo Journal*, 19(21): 5650–5660.
- Ribeiro J.M.C., Andersen J., Silva-Neto M.A.C., Pham V.M., Garfield K.M., Valenzuela J.G. 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 61–79.
- Ribeiro J.M.C., Mans B.J., Arcà B. 2010. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 767-784.
- Ricci C.G., Pinto A.F., Berger M., Termignoni C. 2007. A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol*, 42: 291–300.
- Rios-Steiner J.L., Murakami M.T., Tulinsky A., Arni R.K. 2007. Active and exo-site inhibition of human factor Xa: structure of des-Gla factor Xa inhibited by NAP5, a potent nematode anticoagulant protein from *Ancylostoma caninum*. *J Mol Biol.*, 371(3):774-86.
- Salzet M. 2001. Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS Letters* 492: 187-192.
- Salzet M., Vieau D., Stefano G.B. 1999. Serpins: an evolutionarily conserved survival strategy. *Trends Immunology today* 544 Vol.20 No.12.
- Stein L.D., David J.R. 1986. Cloning of a developmentally regulated tegument antigen of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Volume 20, Issue 3.
- Strube K.-H., Kroger B., Bialojan S., Otte M., Dodt J. 1993. Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. An anticoagulant peptide from the Indian leech. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 268, Issue 12.
- Sugino M., Imamura S., Mulenga A., Nakajima M., Tsuda A., Ohashi K., Onumaa M. 2003. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine* 21: 2844–2851.
- Šlechtová J. Hemostáza – jak ji možná neznáme. 2007. *Klin. Biochem. Metab.*, 15 (36), p. 97–101.
- Stassens P., Bergum P.W., Gansemans Y., Jespers L., Laroche Y., Huang S., Maki S., Messens J., Lauwereys M., Cappello M., Hotez P.J., Lasters I., Vlasuk G.P. 1996. Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(5): 2149–2154.
- Tanaka-Azevedo, Morais-Zani, Torquato R.J.S. 2010. Thrombin inhibitors from different animals. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 10: 1155-641025.
- Tararama C.A., Fariasa P.L., Wilson R.A., de Cerqueira Leite C. 2010. *Schistosoma mansoni* Annexin2: Molecular characterization and immunolocalization. *Experimental Parasitology*, Volume 126, Issue 2.



- Torre-Escudero, Manzano-Román, Siles-Lucas, Pérez-Sánchez R., Moyano J.C., Barrera I., Oleaga A. 2011. *Veterinary Parasitology* 184: 25–36.
- Tsujimoto H., Kotsyfakis M., Francischetti I.M.B., Eum J.H., Strand M.R., Champagne D.E. 2012. Simukunin from the Salivary Glands of the Black Fly *Simulium vittatum* Inhibits Enzymes That Regulate Clotting and Inflammatory Responses. *PLoS ONE* 7(2): e29964.
- Valenzuela J.G., Garfield M., Rowton E.D., Van Pham. 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Experimental Biology* 207: 3717–3729.
- Valenzuela J.G. 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1199–1209.
- Valenzuela J.G., Francischetti I.M., Ribeiro J.M.C. 1999. Purification, Cloning, and Synthesis of a Novel Salivary Anti-thrombin from the Mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry* 38: 11209–11215.
- Van Den Abbeele J., Caljonb G., Dierickc J.-F., Moensd L., De Riddera K., Coosemans M. 2007. The *Glossina morsitans* tsetse fly saliva: General characteristics and identification of novel salivary proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 1075–1085.
- Van de Locht, Stubbs M.T., Bode W., Friedrich T., Bollschweiler C., Höffken W., Huber R. 1996. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *The Embo Journal*. 15(22): 6011–6017.
- Volf a Votýpka. Parazitičtí členovci: Příjem s trávení krve s. 243–245.
- Volf, Horák a kol. (edts.). 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton.
- Waidhet-Kouadio, Yuda M., Ando K., Chinzei Y. 1998. Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1381: 227–233.
- Watanabe R.M.O., Tanaka-Azevedo, Araujo M.S., Juliano M.A., Tanaka A.S. 2010. Characterization of thrombin inhibitory mechanism of rAaTI, a Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with anticoagulant activity. *Biochimie* 93: 618–623.
- Xu X., Yang H., Ma D., Wu J., Wang Y., Song Y., Wang X., LuY., Yang J., Lai R. 2008. Toward an Understanding of the Molecular Mechanism for Successful Blood Feeding by Coupling Proteomics Analysis with Pharmacological Testing of Horsefly Salivary Glands. *Molecular & Cellular Proteomics* 7.3.
- Yi D., Xu L., Yan R., Li X. 2010. *Haemonchus contortus*: Cloning and characterization of serpin. *Experimental Parasitology* 125: 363–370.
- Zang X., Maizels R.M. 2001. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends in Biochemical Sciences* Vol.26 No.3
- Zhang D., Cupp M.S., Cupp E.W. 2002. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 321–330.
- Zhu K., Bowman A.S., Brigham D.L., Essenberg R.C., Dill J.W., Sauer J.R. 1997. Isolation and Characterization of Americanin, a Specific Inhibitor of Thrombin, from the Salivary Glands of the Lone Star Tick *Amblyomma americanum* (L.). *Experimental parasitology* 87: 30–38.